



Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

**Búsqueda de compuestos con potencial terapéutico para la
enfermedad de Parkinson y estudio de la relación entre la
enfermedad de Parkinson y la diabetes mellitus**

Tesis Doctoral

Francisco José Sanz López

Trabajo dirigido por:

Dra. Nuria Paricio Ortiz

Septiembre 2022



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

(Ò ≈) Facultat de
Ciències Biològiques

Dra. **NURIA PARICIO ORTIZ**, Catedrática del Departamento de Genética de la Facultat de Ciències Biològiques de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que Don Francisco José Sanz López licenciado en Farmacia y en Bioquímica, ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación original aquí presentado titulado “Búsqueda de compuestos con potencial terapéutico para la enfermedad de Parkinson y estudio de la relación entre la enfermedad de Parkinson y la diabetes mellitus”, y considera que reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctora en Biomedicina y Biotecnología por la Universitat de València.

Y para que así conste, expide y firma el presente certificado en Valencia, a 5 de septiembre de 2022.

Fdo. Dra. Nuria Paricio Ortiz

AGRADECIMIENTOS

Este espacio se supone que es para agradecer a todas aquellas personas que han llegado a ser importantes, de un modo u otro, en el desarrollo de esta tesis. Cada gesto, cada palabra, cada apoyo han contribuido a que este trabajo salga adelante. Si realizara una lista, la verdad que sería bastante extensa, así que he decidido incluir a aquellos relacionados con el lab y el trabajo. Aunque todos aquellos que no nombre, sé seguro que saben que también están incluidos aquí.

Como no, me gustaría agradecer a Nuria por haberme acogido en su laboratorio y aceptar dirigir esta tesis. A pesar de todas las dificultades, hemos sacado un muy buen trabajo. Yo me siento orgulloso de él. Además, seguro que nos servirá para alcanzar cotas más altas.

Luego, esto que voy a decir ahora no lo reconoceré en persona nunca jamás. Aunque lo pregunten mil veces siempre diré que lo escribí bajo coacción y torturas... Pues eso, ahí va... Quiero agradecer a Cristina por el apoyo que desde el primer día he recibido de su parte. Creo que no podría haber encontrado una compañera mejor. Obviamente, no te considero solamente como una compañera sino como una fantástica amiga para toda la vida.

Raro sería no dedicar unas palabras también a la gente de molecular. Ese grupo tan animado y con unas conversaciones muy surrealistas. Caballero Kike, Josep y Javi, no sería justo que el consejo de sabios no apareciera aquí. Así como Xavi, todo un maestro del sentido del humor. ¡Sigo sin saber por qué la gente no se quiere divertir!

Otro grupo al que quiero agradecer por todo este tiempo es a las chicas de Biomol, las cuales siempre me han hecho pasar muy buenos momentos. Y eso sí, mención aparte a esas grandes frases de una de sus miembros, qué lástima no haber hecho una lista de todas ellas.

No puedo olvidarme tampoco de mi grupito de “de tranquis”, esos viernes tarde marcarán una época. Y muy en especial a mi BRO. Sí sí, reconócelo ya y deja de ocultarlo, ¡me llamaste BRO! En esta nueva etapa solo nos esperan éxitos, muchos. Y nunca lo olvides, el objetivo es ser ricos. No veas lo que está costando...

Todos vosotros podéis haceros partícipes de este trabajo. Me alegro mucho de haber obtenido vuestra amistad y de haber pasado todo este tiempo con vosotros. Y bueno, nada más que añadir.

MUCHAS GRACIAS

“Solo aquellos que intentan el absurdo
pueden lograr lo imposible”

ALBERT EINSTEIN

“El sabio es consciente
de que la clave está en las preguntas”

PLATÓN

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	13
1.1 La enfermedad de Parkinson.....	15
1.1.1. Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson.....	15
1.1.2. Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Parkinson.....	17
1.1.3. Mecanismos moleculares de patogénesis de la enfermedad de Parkinson.....	18
1.1.4. Etiología de la enfermedad de Parkinson.....	19
1.1.5. Diagnóstico de la enfermedad de Parkinson.....	21
1.1.6. Tratamiento actual de la enfermedad de Parkinson.....	21
1.1.7. Búsqueda de nuevos tratamientos para la enfermedad de Parkinson..	23
1.1.7.1 Estrategias para la identificación de nuevos tratamientos.....	24
1.1.7.2 Nuevos compuestos candidatos para tratar la enfermedad de Parkinson.....	26
1.1.7.3 Compuestos en ensayos clínicos.....	26
1.1.8. Modelos preclínicos para el estudio de la enfermedad de Parkinson..	28
1.1.8.1 Modelos celulares.....	28
1.1.8.2 Modelos invertebrados.....	29
1.1.8.3 Modelos de mamíferos.....	30
1.1.9. La proteína DJ-1.....	30
1.1.10. Mutantes <i>DJ-1β</i> en <i>Drosophila</i> como modelos de la enfermedad de Parkinson.....	33
1.1.10.1 Uso de <i>Drosophila</i> en la identificación de compuestos para la enfermedad de Parkinson.....	34
1.2. Diabetes Mellitus.....	35
1.2.1. Tipos de Diabetes Mellitus.....	36
1.2.2. Ruta de señalización de la insulina y su implicación en el sistema nervioso central.....	37
1.2.3. Relación de la Diabetes Mellitus con la enfermedad de Parkinson.....	38
1.2.4. Modelos de Diabetes Mellitus en <i>Drosophila</i>	39
1.2.5. Reposicionamiento de fármacos antidiabéticos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.....	40
OBJETIVOS	43
MATERIAL Y MÉTODOS	47
3.1. Material biológico.....	49
3.1.1. Stocks de <i>Drosophila melanogaster</i> y medio de cultivo.....	49
3.1.1.1. Modelo de la enfermedad de Parkinson esporádica en <i>Drosophila</i> inducido con rotenona.....	49

3.1.1.1. Modelo de la Diabetes Mellitus tipo 2 en <i>Drosophila</i>	50
3.1.2. Modelo celular de la enfermedad de Parkinson y medio de cultivo.....	50
3.1.3. Modelo de la Diabetes Mellitus tipo 2 de ratón.....	50
3.2. Tratamientos de los modelos de <i>Drosophila</i> y del modelo celular con compuestos potencialmente terapéuticos.....	51
3.2.1. Rastreo a gran escala en moscas mutantes <i>DJ-1β</i>	51
3.2.2. Tratamiento de moscas mutantes <i>park</i> con los compuestos candidatos.....	51
3.2.3. Tratamiento de las moscas modelo de la Diabetes Mellitus tipo 2 con metformina.....	51
3.2.4. Tratamiento del modelo celular de la enfermedad de Parkinson con los compuestos candidatos.....	51
3.3. Ensayo de escalada en <i>Drosophila</i>	52
3.4. Ensayo de supervivencia en <i>Drosophila</i>	52
3.5. Estimación del peso de moscas adultas.....	53
3.6. Cuantificación de niveles de glucógeno y carbohidratos solubles en extractos de <i>Drosophila</i>	53
3.7. Ensayo de viabilidad en células SH-SY5Y.....	53
3.8. Cuantificación de actividades enzimáticas.....	54
3.8.1. Extracción de proteínas para la realización de los ensayos enzimáticos.....	54
3.8.2. Actividad enolasa.....	55
3.8.3. Actividad fosfofructoquinasa.....	55
3.8.4. Actividad hexoquinasa.....	55
3.8.5. Actividad piruvato quinasa.....	56
3.9. Cuantificación de los niveles de ATP.....	56
3.10. Cuantificación de los niveles de estrés oxidativo.....	57
3.10.1. Cuantificación de niveles de H ₂ O ₂ en extractos de <i>Drosophila</i>	57
3.10.2. Cuantificación de niveles de carbonilación de proteínas en extractos de <i>Drosophila</i>	57
3.10.3. Cuantificación de los niveles de O ₂ ⁻ en células SH-SY5Y.....	58
3.11. Western blot.....	58
3.11.1. Extracción de proteínas.....	58
3.11.2. Electroinmunotransferencia de proteínas.....	59
3.12. Análisis de la viabilidad mitocondrial en células SH-SY5Y.....	60
3.13. Cuantificación de la expresión de genes mediante PCR cuantitativa en tiempo real.....	61
3.13.1. Diseño de cebadores.....	61
3.13.2. Extracción de ARN.....	61
3.13.3. Obtención del ADNc.....	62
3.13.4. RT-qPCR.....	62
3.14. Análisis estadístico.....	62

RESULTADOS	65
4.1. Identificación de compuestos potencialmente terapéuticos para la enfermedad de Parkinson mediante la realización de un rastreo a gran escala.....	67
4.1.1. Estudio del efecto del zaprinast en modelos de la enfermedad de Parkinson.....	69
4.1.1.1. El zaprinast suprime fenotipos relacionados con la enfermedad de Parkinson en diferentes modelos de <i>Drosophila</i>	70
4.1.1.2. El zaprinast ejerce un papel antiapoptótico mediante la activación de la ruta de Akt y la inhibición de la vía de la JNK en células mutantes <i>DJ-1</i>	70
4.1.1.3. El zaprinast aumenta la viabilidad mitocondrial en células mutantes <i>DJ-1</i>	74
4.1.1.4. El zaprinast aumenta la actividad de enzimas clave de la glucólisis en células mutantes <i>DJ-1</i>	75
4.1.1.5. El CID2745687, un antagonista del receptor GPR35, reduce el efecto neuroprotector de zaprinast en células mutantes <i>DJ-1</i>	76
4.1.2. Estudio del efecto de la vincamina en modelos de la enfermedad de Parkinson.....	78
4.1.2.1. La vincamina reduce los niveles de estrés oxidativo en moscas mutantes <i>DJ-1β</i>	78
4.1.2.2. La vincamina aumenta la supervivencia en células mutantes <i>DJ-1</i> mediante la reducción de la activación de la vía de la JNK.....	79
4.1.2.3. La vincamina aumenta la viabilidad mitocondrial y reduce los niveles de ROS en células mutantes <i>DJ-1</i>	81
4.1.2.4. La veratradina, un activador de los canales de Na ⁺ dependiente de voltaje, reduce el efecto neuroprotector de vincamina en células mutantes <i>DJ-1</i>	82
4.1.3. Estudio del efecto de otros compuestos identificados en el rastreo a gran escala.....	84
4.1.3.1. Ácido retinoico.....	84
4.1.3.2. Fentolamina.....	85
4.2. Estudio de la relación entre la enfermedad de Parkinson y la Diabetes Mellitus tipo 2.....	86
4.2.1. Análisis de los niveles de carbohidratos en modelos de la enfermedad de Parkinson en <i>Drosophila</i>	86
4.2.2. Alteraciones en el metabolismo de carbohidratos en moscas modelo de la Diabetes Mellitus tipo 2.....	88
4.2.3. Estudio de la relación entre moscas modelo de la enfermedad de Parkinson y de la Diabetes Mellitus tipo 2.....	90

4.2.4. Estudio del efecto de la deficiencia del gen <i>Dj-1</i> en moscas cultivadas en una dieta rica en azúcares.....	93
4.2.5. Efecto de niveles elevados de glucosa en un modelo de Diabetes Mellitus tipo 2 en ratón y en células humanas SH-SY5Y.....	95
4.2.6. Efecto de la metformina en células mutantes <i>Dj-1</i> y en moscas modelo de la Diabetes Mellitus tipo 2.....	97
DISCUSIÓN.....	101
5.1. Uso de <i>Drosophila</i> para la identificación de compuestos candidatos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.....	103
5.1.1. El zaprinast, un inhibidor de PDE y agonista del receptor GPR35, es un potencial tratamiento para la enfermedad de Parkinson.....	103
5.1.2. La vincamina, un compuesto natural, ejerce un efecto beneficioso en modelos de la enfermedad de Parkinson.....	105
5.1.3. Otros compuestos candidatos para tratar la enfermedad de Parkinson identificados en el RGE.....	107
5.1.4. Estrategias alternativas para la identificación de nuevos candidatos para tratar la enfermedad de Parkinson.....	109
5.1.5. Posibles mejoras para la búsqueda de nuevos tratamientos para la enfermedad de Parkinson.....	110
5.2. Dos enfermedades crónicas relacionadas: la enfermedad de Parkinson y la Diabetes Mellitus tipo 2.....	112
CONCLUSIONES.....	117
BIBLIOGRAFÍA.....	121
ANEXOS.....	149

ABREVIATURAS

ADNc	ADN complementario
ARNi	ARN de interferencia
ATP	Adenosina trifosfato
Ca ²⁺	Calcio
CAC	Ciclo del ácido cítrico
Cas	Sistema asociado a CRISPR (del inglés CRISPR associated system)
CM	Medio control (del inglés control medium)
COMT	Catecol O-metil transferasa
CRISPR	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (del inglés <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat</i>)
CTE	Cadena de transporte electrónico
DA	Dopaminérgicas
DM	Diabetes Mellitus
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco (del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMT1	Diabetes Mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DPP-4	Dipeptidil-peptidasa 4
EA	Enfermedad de Alzheimer
EMA	Agencia Europea de Medicamentos (del inglés <i>European Medicines Agency</i>)
EN	Enfermedad neurodegenerativa
Eno	Enolasa
EO	Estrés oxidativo
EP	Enfermedad de Parkinson
EPe	Enfermedad de Parkinson esporádico
EPf	Enfermedad de Parkinson familiar
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (del inglés Food and Drug Administration)
GABA	Ácido γ -aminobutírico (del inglés γ -aminobutyric acid)
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía (del inglés <i>glial derivate neurotrophic factor</i>)
GLP-1	Péptido parecido al glucagón 1 (del inglés <i>glucagon-like peptide-1</i>)
GPR35	Receptor acoplado a proteína G 35 (del inglés <i>G Protein-Coupled Receptor 35</i>)
GSK-3	Glucógeno-sintasa quinasa 3 (del inglés glycogen synthase kinase-3)
GWAS	Estudio de asociación de genoma completo (del inglés <i>Genome-wide association studies</i>)
HbA1c	hemoglobina A1c
Hex-A	Hexoquinasa A (<i>Drosophila</i>)

HFD	Dieta rica en grasa (del inglés high-fat diet)
Hk	Hexoquinasa (del inglés hexokinase)
HSM	Medio rico en azúcar (del inglés high-sugar medium)
ILP	Péptido parecido a la insulina (del inglés insulin like peptide)
IPC	Célula productora de insulina (del inglés insulin-producing cell)
iPSC	Célula madre pluripotente inducida (del inglés induced pluripotent stem cell)
Keap1	Proteína 1 tipo Kelch asociada a ECH (del inglés <i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>)
LCR	Líquido cefalorraquídeo
L-DOPA	levodopa (L-3,4 dihidroxifenilalanina)
LID	discinesias inducidas por L-DOPA (del inglés levodopa-induced dyskinesia)
MAO-B	Monoamino oxidasa B
MAPK	Proteína quinasas activadas por mitógenos (del inglés <i>mitogen-activated protein kinases</i>)
MCP1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1 (del inglés <i>monocyte chemoattractant protein 1</i>)
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (del inglés 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazol
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (del inglés <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
ND	Dieta normal (del inglés normal diet)
Nrf2	Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (del inglés nuclear factor erythroid 2-related factor)
Parkin	Proteína ubiquitina ligasa E3 (del inglés <i>E3 ubiquitin protein ligase</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés polymerase chain reaction)
PET	Tomografía por emisión de positrones (del inglés positron emission tomography)
Pfk	Fosfofructoquinasa (del inglés phosphofructokinase)
PGK1	Fosfoglicerato quinasa (del inglés <i>phosphoglycerate kinase 1</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa (del inglés <i>phosphatidylinositol 3 kinase</i>)
PINK1	Quinasa putativa inducida por PTEN 1 (del inglés PTEN Induced Putative Kinase 1)
Pk	Piruvato quinasa (del inglés pyruvate kinase)
PKB	Proteína quinasa B (del inglés <i>protein kinase B</i>)
PyK	Piruvato quinasa (<i>Drosophila</i>) (del inglés pyruvate kinase)
RE	Retículo endoplasmático
RGE	Rastreo a gran escala
ROS	Especies reactivas del oxígeno (del inglés reactive oxygen species)
RSI	Ruta de señalización de la insulina

RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real (del inglés real quantitative PCR)
s.d.	Desviación estándar (del inglés standard deviation)
SERCA	Bomba de Ca ²⁺ -ATPasa del retículo sarco(endo)plasmático (del inglés sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase)
SFB	Suero fetal bovino
SNC	Sistema nervioso central
SNpc	Substantia nigra pars compacta
SOD	Superóxido dismutasa
SPECT	Tomografía computarizada de emisión monofotónica (del inglés single photon emission computed tomography)
TH	Tirosina hidroxilasa
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α (del inglés <i>tumor necrosis factor α</i>)

INTRODUCCIÓN

1. La enfermedad de Parkinson

Los primeros registros que se tienen de la enfermedad de Parkinson (EP) son muy antiguos. En la India, se disponía de un sistema de medicina tradicional llamado *Ayurveda*, en el que se describía una enfermedad caracterizada por movimientos involuntarios y denominada *Kampavata* (Ayajuddin et al., 2018). Sin embargo, no fue hasta los tiempos modernos cuando se caracterizó dicha enfermedad. En 1817, el Dr. James Parkinson presentó por primera vez en 6 pacientes una enfermedad desconocida, que describió como: “*Involuntary tremulous motion, with lessened muscular power, in parts not in action and even when supported; with a propensity to bend the trunk forward, and to pass from a walking to a running pace: the senses and intellects being uninjured.*” (Goetz, 2011). Esta enfermedad fue posteriormente denominada “enfermedad de Parkinson” por el Dr. Jean-Martin Charcot, que además identificó la bradicinesia como un rasgo fundamental de la misma (Dorsey et al., 2018; Goetz, 2011).

Actualmente, la EP es la segunda enfermedad neurodegenerativa (EN) más frecuente, solo por detrás de la enfermedad de Alzheimer (EA) (Mahmood et al., 2021; Maruthi Prasad & Hung, 2021). La EP afecta a más del 1% de la población mayor de 65 años (Gouda et al., 2022). Actualmente, alrededor de 10 millones de personas en todo el mundo padecen esta enfermedad (Church, 2021; Gouda et al., 2022). Además, debido al creciente envejecimiento de la población, a la exposición a pesticidas y a la mejora en el diagnóstico de la EP, se estima que ese número se duplique en 10-20 años (Gouda et al., 2022; Mahmood et al., 2021). De hecho, la EP es actualmente la enfermedad neurológica con un mayor crecimiento en el número de casos a nivel mundial (Fletcher et al., 2021). A pesar de no ser una enfermedad infecciosa, la EP se ha empezado a considerar una enfermedad pandémica ya que cumple con algunas de las principales características que éstas presentan. Entre ellas, se podría destacar que la EP se extiende por todo el mundo, que está en constante aumento y que nadie es inmune a esta enfermedad (Bloem et al., 2021; Dorsey et al., 2018). Por otra parte, la EP también supone una fuerte carga económica tanto para las familias que tienen algún miembro sufriendo la enfermedad, como para los diferentes países (McFarthing et al., 2021). Por lo tanto, el incremento esperado del número de casos de EP podría tener un efecto tremendamente negativo en este aspecto (McFarthing et al., 2021).

1.1. Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson

La EP se caracteriza por la degeneración selectiva de neuronas dopaminérgicas (DA) en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc), lo que conduce a una reducción de los niveles de dopamina en el estriado (Fig. 1A). Esta reducción de los niveles de dopamina altera los circuitos por los que los ganglios basales controlan el movimiento (Vázquez-Vélez et al., 2021). En el estriado encontramos neuronas eferentes que forman parte de dos vías muy bien diferenciadas, la vía directa y la vía indirecta (Sharma et al., 2022). En la vía directa, la activación de los receptores

dopaminérgicos D1 conduce a un aumento del ácido γ -aminobutírico (GABA), que tiene un efecto inhibitorio sobre la *substantia nigra pars reticulata* y el *globus pallidus interna*. Mientras, en la vía indirecta se produce una inhibición del *globus pallidus externa* a través de la acción de GABA (Sharma et al., 2022). La inhibición de la vía directa, que tiene una función facilitadora del movimiento, junto con la activación de la vía indirecta, con función inhibitoria del movimiento, son las responsables de la aparición de la bradicinesia, uno de los síntomas más característicos de la EP (Bloem et al., 2021).

Sin embargo, la degeneración no se limita a las neuronas DA, ya que se ha demostrado que también se produce la muerte de otros tipos neuronales en el sistema nervioso central (como por ejemplo en el ganglio basal, hipotálamo y bulbo olfatorio), periférico y autónomo (Feraco et al., 2021; Koszła et al., 2021). Esto hace que en pacientes con la EP también se vea afectada la homeostasis de otros muchos neurotransmisores, encontrándose alteraciones en las rutas colinérgicas, glutaminérgicas, GABAérgicas, serotoninérgicas, noradrenérgicas o histaminérgicas (Ahmad et al., 2022; Koszła et al., 2021).

Otro de los rasgos característicos de la EP es la formación de inclusiones intracitoplasmáticas de proteínas, entre las que destaca la α -sinucleína, llamadas cuerpos de Lewy (Fig. 1B) (Feraco et al., 2021), aunque no son específicas de la EP, ya que se pueden encontrar en otras enfermedades como en la demencia con cuerpos de Lewy y en la atrofia multisistémica (Feraco et al., 2021). Curiosamente, se ha propuesto que esta acumulación de agregados de α -sinucleína puede ser una de las causas de la aparición de alteraciones que llevan a la pérdida neuronal, como pueden ser el aumento de la inflamación, la alteración de la morfología mitocondrial, la disfunción sináptica, la aparición de estrés del retículo endoplásmico (RE) y la dishomeostasis de algunos iones (Balakrishnan et al., 2021).

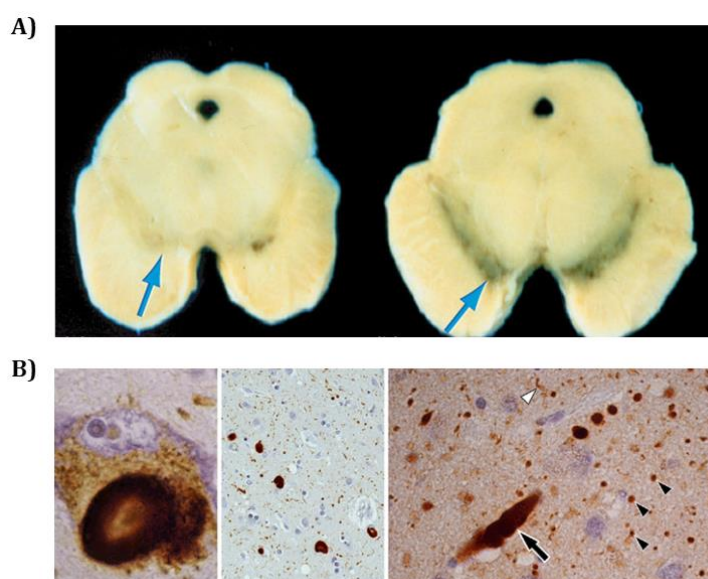


Figura 1. Neurodegeneración dopaminérgica y cuerpos de Lewy en la EP. (A) Sección del mesencéfalo donde se ve una disminución de la pigmentación en la SNpc (señalada por una flecha

azul) de un paciente con la EP (izquierda) en comparación con una persona sana (derecha). La intensidad en la pigmentación corresponde con la cantidad de neuronas DA. (B) Imagen obtenida mediante microscopía de cuerpos de Lewy (estructuras de color marrón oscuro) presentes en la SNpc (imagen de la izquierda) y en el córtex temporal (imagen del medio y de la derecha). Imágenes obtenidas y adaptadas de Constantino & Honig, 2001; Wakabayashi et al. (2012)

1.2. Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Parkinson

La EP se caracteriza principalmente por la aparición de síntomas motores, entre los que destacan el temblor en reposo, la bradicinesia, la inestabilidad postural y la rigidez (Mahmood et al., 2021). Sin embargo, los pacientes con EP también presentan síntomas no motores, como pueden ser hiposmia, estreñimiento, disfagia, disfunciones autonómicas, desórdenes del sueño y del estado de ánimo, pérdida del sentido del olfato y problemas cognitivos, que pueden llegar a producir incluso demencia (Feraco et al., 2021; Gouda et al., 2022; Mahmood et al., 2021). Además, también pueden aparecer problemas musculoesqueléticos, los cuales suelen ir acompañados de dolor (Kaiserova et al., 2021). La aparición de estos síntomas no motores tiene una gran repercusión en la disminución de la calidad de vida de los pacientes (Vos & Klein, 2021). Curiosamente, muchos de estos síntomas no motores aparecen años, o incluso décadas, antes del desarrollo de los síntomas motores, y a esta fase de la enfermedad se le denomina fase prodrómica (Fig. 2) (Kaiserova et al., 2021). Actualmente se considera que la aparición de los síntomas motores en la EP está relacionada con la alteración de la vía nigroestriatal, mientras que los síntomas no motores parecen estar relacionados con alteraciones en otras regiones del cerebro (Fletcher et al., 2021).

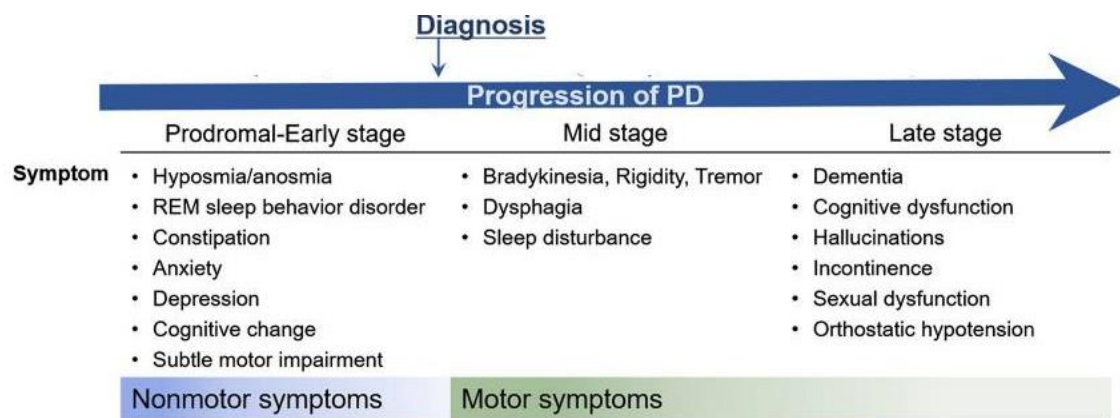


Figura 2. Síntomas clínicos presentes en la EP y fase de aparición. La imagen muestra un resumen de los síntomas clínicos característicos de la EP y en que estadio aparecen. Las etapas de la EP se pueden diferenciar en 2, la fase prodrómica, que tiene lugar antes del diagnóstico de la enfermedad y que se caracteriza por los síntomas no motores; y por la fase en que la EP ya ha sido diagnosticada, en la que empiezan a aparecer los síntomas motores. Imagen adaptada de Bang et al. (2021).

1.3. Mecanismos moleculares de patogénesis de la enfermedad de Parkinson

La etiología de la EP es aún desconocida. Sin embargo, está bastante aceptado que es una enfermedad multifactorial (Avazzadeh et al., 2021; Koszła et al., 2021). Entre ellos se ha encontrado que las alteraciones mitocondriales, los errores en el plegamiento de proteínas (especialmente de la α -sinucleína), los defectos en la autofagia, las modificaciones epigenéticas, un aumento de los niveles de estrés oxidativo (EO), el estrés del RE, los procesos inflamatorios y las alteraciones en la homeostasis del calcio (Ca^{2+}) y del metabolismo, pueden jugar un papel importante en la aparición de la EP (Anandhan et al., 2017; Groenendyk et al., 2021; Mahmood et al., 2021; Poewe et al., 2017; Solana-Manrique et al., 2020, 2021, 2022).

Las alteraciones mitocondriales parecen jugar un papel clave en el desarrollo de las EN. En el caso de la EP, se han encontrado defectos en el complejo I de la cadena de transporte electrónico (CTE) (Aryal & Lee, 2019; Perier & Vila, 2012). De hecho, se cree que la alteración de este complejo en neuronas DA puede jugar un papel clave en el desarrollo de la enfermedad (Aryal & Lee, 2019). Los defectos en la CTE producen una fuga de electrones en esta ruta, lo que acaba generando un aumento de los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Aryal & Lee, 2019; Perier & Vila, 2012). Por lo tanto, las alteraciones mitocondriales podrían ser la causa principal de la presencia de los niveles elevados de EO característicos de la EP. Sin embargo, la alteración del complejo I de la CTE también puede afectar a la homeostasis del metabolismo energético, ya que la reducción de su actividad puede conducir a una reducción de los niveles de adenosina trifosfato (ATP) (Aryal & Lee, 2019). Esta reducción de los niveles de ATP ha hecho que también se ponga el foco sobre las alteraciones metabólicas en la EP. De hecho, actualmente se está empezando a considerar que las alteraciones metabólicas pueden ser factores clave en la enfermedad, hasta el punto de considerar la EP como un desorden metabólico. Algunos autores han hipotetizado incluso que estas alteraciones podrían ser el factor que desencadena el inicio de la enfermedad (Anandhan et al., 2017; Błaszczuk, 2018). Otra de las alteraciones características de la EP es la alteración en la homeostasis del Ca^{2+} . Una desregulación de sus niveles se asocia con un aumento de los niveles de ROS, así como con alteraciones de la función de la mitocondria y del RE (Surmeier et al., 2017). De hecho, las alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} se han relacionado no solo con la EP, sino con otras EN, lo que confirma que este ion juega un papel fundamental en el mantenimiento de la actividad a nivel del sistema nervioso central (SNC) (Alvarez et al., 2020). Por otra parte, también se han descrito defectos en la microglía en esta enfermedad. En condiciones fisiológicas, estas células promueven el buen funcionamiento de las neuronas mediante la secreción de factores neurotróficos y la eliminación del glutamato sináptico, entre otras funciones (Pajares et al., 2020). Sin embargo, cuando están sobreactivadas, las células de la microglía liberan factores proinflamatorios y ROS, lo que conduce a la muerte de las neuronas (Pajares et al., 2020).

1.4. Etiología de la enfermedad de Parkinson

La mayoría de los casos de EP (85-90%) son esporádicos (EPe). Su causa todavía se desconoce, pero se cree que el envejecimiento, las alteraciones genéticas, algunos factores medioambientales y/o haber padecido alguna lesión cerebral traumática pueden ser elementos clave en su desarrollo (Vázquez-Vélez et al., 2021). Entre los factores medioambientales encontramos la exposición a tóxicos mitocondriales (como la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina, MPTP) o a pesticidas (como el paraquat o la rotenona). En cuanto a los factores genéticos, *Genome-wide association studies* (GWAS) han identificado alrededor de 90 genes relacionados con un aumento del riesgo de padecer la enfermedad (Bloem et al., 2021; Vázquez-Vélez et al., 2021). Aunque individualmente no representan un riesgo alto, se estima que las alteraciones en varios de ellos pueden constituir un 25% del riesgo total de desarrollar la EP (Day & Mullin, 2021; Vázquez-Vélez et al., 2021). Por otra parte, se ha descubierto que el 10-15 % de los casos de EP se deben a mutaciones en determinados genes, cuya presencia es suficiente para causar la enfermedad (Day & Mullin, 2021). En los últimos 25 años se han identificado alrededor de 20 genes causantes de formas monogénicas de EP de aparición temprana y de síntomas atípicos (Tabla 1) (Blauwendraat et al., 2020; Gouda et al., 2022; Mahmood et al., 2021). Estos casos de la EP son hereditarios, presentan diferentes patrones de herencia y se conocen como EP familiar (EPf).

Tabla 1. Listado de genes causantes de formas monogénicas de la EP. Adaptada de Blauwendraat et al. (2020) y Gouda et al. (2022). AD, autosómica dominante; AR, autosómica recesiva

Locus	Gen	Patrón de herencia	Frecuencia alélica
PARK1/PARK4	<i>SNCA</i>	AD	Rara
PARK2	<i>Parkin</i>	AR	Rara
PARK5	<i>UCHL1</i>	AD	Desconocida
PARK6	<i>PINK1</i>	AR	Rara
PARK7	<i>DJ-1</i>	AR	Rara
PARK8	<i>LRRK2</i>	AD	Común
PARK9	<i>ATP13A2</i>	AR	Rara
PARK11	<i>GIGYF2</i>	AD	Rara
PARK13	<i>HTRA2</i>	AD	Desconocida
PARK13	<i>VPS13C</i>	AR	Rara
PARK14	<i>NBIA/DYT/PARK-PLA2G6</i>	AR	Rara

PARK15	<i>FBX07</i>	AR	Rara
PARK17	<i>VPS35</i>	AD	Rara
PARK18	<i>EIF4G1</i>	AD	Desconocida
PARK19	<i>DNAJC6</i>	AD	Rara
PARK20	<i>SYNJ1</i>	AR	Rara
PARK21	<i>DNAJC13</i>	AD	Desconocida
No conocido	<i>POLG</i>	AD	Rara
No conocido	<i>TMEM30</i>	AD	Desconocida
No conocido	<i>LRP10</i>	AD	Desconocida
No conocido	<i>UQCRC1</i>	AD	Desconocida
No conocido	<i>SCA2</i>	AD	Desconocida
No asignado	<i>GBA</i>	AD	Común

Curiosamente, el descubrimiento de estos genes ha sido tremendamente importante para el estudio de la EP. El estudio de la función de estos genes a nivel celular ha permitido dilucidar algunos de los mecanismos implicados en el desarrollo de la enfermedad (Fig. 3) (Gouda et al., 2022; Vázquez-Vélez et al., 2021).

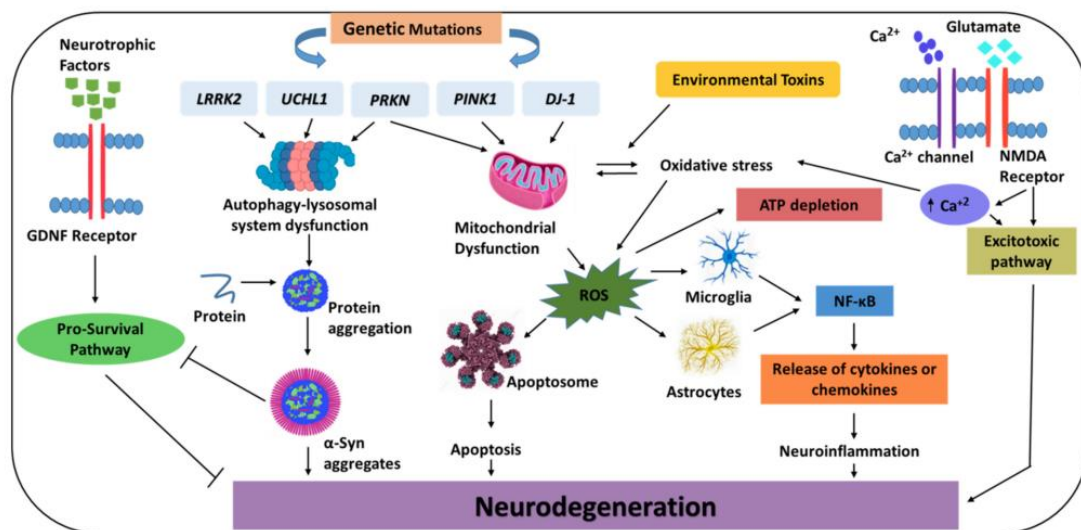


Figura 3. Mecanismos implicados en la aparición de neurodegeneración en la EP. La imagen nos muestra un resumen de los mecanismos patológicos implicados en la aparición de la EP. Estos han sido identificados gracias al estudio de la función de los genes implicados en la aparición de casos de EPf. Imagen obtenida de Gouda et al. (2022).

1.5. Diagnóstico de la enfermedad de Parkinson

A fecha de hoy, el diagnóstico de la EP sigue realizándose mediante la detección de síntomas motores. La presencia de bradicinesia, junto con el temblor en reposo y/o rigidez son los criterios utilizados para el diagnóstico de la enfermedad (Mahlknecht et al., 2022). Sin embargo, estos síntomas motores aparecen cuando ya se han perdido entre el 40-60% de las neuronas DA, y los niveles de dopamina en el estriado se han reducido aproximadamente un 60-70% (Mahlknecht et al., 2022). Por lo tanto, la búsqueda de nuevas formas de diagnóstico que permitan una detección temprana de la EP se ha convertido en una prioridad (Bang et al., 2021; Gouda et al., 2022). Entre las estrategias utilizadas para la identificación de nuevos marcadores, se encuentra la realización de una búsqueda exhaustiva de alteraciones bioquímicas en muestras de sangre o de líquido cefalorraquídeo (LCR). De hecho, las muestras de LCR se consideran excelentes ya que las proteínas y los péptidos del SNC pueden difundir al LCR. Además, muchas de las alteraciones bioquímicas que se producen a nivel del SNC se reflejan en el LCR (Gouda et al., 2022).

Otra de las estrategias que se están llevando a cabo para conseguir un diagnóstico precoz de la EP es el uso de técnicas de neuroimagen (Feraco et al., 2021; Kaiserova et al., 2021). Entre ellas, podríamos destacar la tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT) o la tomografía por emisión de positrones (PET) para la identificación de la función dopaminérgica en los ganglios basales; o también el uso de la sonografía transcraneal para tener una visión directa de la SNpc (Feraco et al., 2021; Kaiserova et al., 2021).

El gran objetivo de encontrar biomarcadores que permitan detectar la EP en una fase temprana es mejorar los tratamientos actuales. Poder detectar la enfermedad cuando aún no se ha producido una pérdida importante de neuronas DA permitirá cambiar la estrategia farmacológica actual, basada en la restitución de la actividad dopaminérgica, y empezar a usar compuestos que eviten la neurodegeneración (Mahlknecht et al., 2022; Tolosa et al., 2021). De hecho, se piensa que muchos de los compuestos que fallan en los ensayos clínicos lo hacen porque los pacientes sobre los que éstos se prueban se encuentran ya en fases avanzadas de la enfermedad (Mahlknecht et al., 2022)

1.6. Tratamiento actual de la enfermedad de Parkinson

La EP es una enfermedad que no tiene cura (Gouda et al., 2022). El tratamiento actual es totalmente sintomático, y no es capaz de parar o de ralentizar la progresión de la enfermedad (Gouda et al., 2022; Sharma et al., 2022). Estos tratamientos se basan principalmente en la restitución de la actividad dopaminérgica, la cual se ha perdido debido a la degeneración de las neuronas DA (Fig. 4) (Majali et al., 2021). Entre los tratamientos utilizados destacan los precursores de la dopamina, los agonistas dopaminérgicos y los inhibidores de la degradación de la dopamina. El uso de levodopa (L-DOPA, L-3,4 dihidroxifenilalanina) un precursor de la dopamina, a partir de 1970, supuso un avance muy importante en el tratamiento de la EP ya que se comprobó que era muy eficaz contra los síntomas motores de la enfermedad. La L-DOPA se utiliza junto a un inhibidor del enzima L-DOPA descarboxilasa

(carbodopa), para evitar que sea metabolizada a dopamina a nivel periférico, evitándose así sus efectos adversos (Church, 2021). Sin embargo, a pesar de su eficacia inicial, el tratamiento con L-DOPA presenta problemas en tratamientos crónicos, produciéndose una pérdida progresiva de su eficacia y la aparición de discinesias (conocidas como discinesias inducidas por L-DOPA, o LID) en aproximadamente un 40-75% de los pacientes (Ahmad et al., 2022; Hauser et al., 2021; Majali et al., 2021). Junto con el tratamiento con L-DOPA, se suelen utilizar también inhibidores de su metabolismo a nivel central, como pueden ser los inhibidores de la monoamino oxidasa B (MAO-B) y los inhibidores de la catecol O-metil transferasa (COMT) (Gouda et al., 2022). Éstos permiten reducir la dosis de L-DOPA a utilizar, limitando así sus efectos adversos. Cabe destacar también que los inhibidores de la MAO-B se pueden utilizar incluso como monoterapia en los estadios iniciales de la enfermedad, debido a que también presentan efecto neuroprotector (Gouda et al., 2022; Majali et al., 2021). Otra alternativa para el tratamiento de la EP son los agonistas dopaminérgicos. Éstos se pueden usar como monoterapia en los primeros estadios de la enfermedad, teniendo una efectividad similar al tratamiento con L-DOPA, pero con una duración menor (Church, 2021). Además, los agonistas dopaminérgicos también se utilizan juntamente con el tratamiento de L-DOPA para minimizar la pérdida de eficacia del compuesto (Church, 2021).

Además de fármacos directamente relacionados con el metabolismo de la dopamina, actualmente también se están utilizando otros compuestos con diferentes mecanismos de acción. Entre ellos encontramos a los antagonistas del glutamato que, a bajas dosis, son capaces de reducir la denervación de las neuronas DA en el estriado (Gouda et al., 2022). Otros compuestos también utilizados en la EP son aquellos con actividad anticolinérgica, ya que se ha visto que la restauración del balance entre dopamina y acetilcolina tiene un efecto beneficioso en los pacientes reduciendo los temblores, especialmente en las fases tempranas de la enfermedad (Gouda et al., 2022). Además, recientemente se ha introducido otro compuesto con actividad antagonista frente a los receptores de adenosina A2A, que consigue mejorar la actividad motora a través de los receptores D2 de dopamina (Majali et al., 2021).

Por otra parte, también se han utilizado métodos quirúrgicos en la EP. Por ejemplo, uno de los procedimientos que se utilizan es el *deep brain stimulation* en pacientes que sufren LID. Éste es un procedimiento no destructivo, pero que se ha relacionado con alteraciones neuropsiquiátricas. Posteriormente, también se ha desarrollado un procedimiento llamado *magnetic resonance-guided focused ultrasound ablation*, que es menos invasivo y más preciso detectando las lesiones en el tálamo (Gouda et al., 2022; Lee & Yankee, 2021).

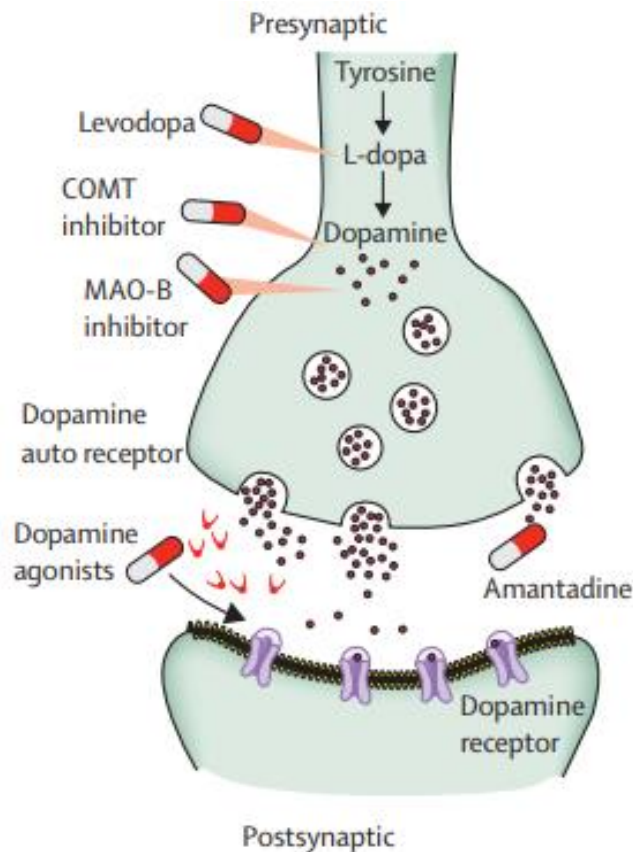


Figura 4. Tratamiento actual de la EP. El tratamiento actual de la EP se basa en la restitución de la actividad dopaminérgica en la SNpc. La imagen representa un resumen de los tratamientos actuales de la EP, señalando su mecanismo de acción y su lugar de acción. Imagen obtenida de Bloem et al. (2021).

Aunque los síntomas más característicos de la EP son los síntomas motores, ésta presenta otros síntomas no relacionados con la alteración del movimiento. Es más, algunos de ellos pueden aparecer como consecuencia de la terapia para restituir la actividad dopaminérgica. Entre ellos se pueden destacar la ansiedad, la depresión o los problemas gastrointestinales. Debido a ello, los pacientes con EP necesitan de tratamientos específicamente dirigidos a esos síntomas (Church, 2021). Por ejemplo, para tratar los síntomas relacionados con la ansiedad o la depresión se suelen utilizar benzodicepinas, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, o antidepresivos tricíclicos, entre otros. En cuanto a las alteraciones gastrointestinales, se suelen usar compuestos que eviten el estreñimiento (p.e. lubiprostone), o las náuseas y vómitos (p.e. ondansetrón) (Church, 2021).

1.7 Búsqueda de nuevos tratamientos para la enfermedad de Parkinson

Debido a la limitada eficacia de los tratamientos actuales para la EP, dirigidos solamente a aliviar los síntomas de la enfermedad, junto con el aumento previsto del número de casos en un futuro próximo, es esencial identificar nuevos compuestos más efectivos, y que sean capaces de ralentizar o incluso parar la progresión de la

enfermedad (Gouda et al., 2022; Sharma et al., 2022). Sin embargo, la búsqueda de nuevos compuestos suele ser un proceso largo y con poco exitoso (Aldewachi et al., 2021; Maruthi Prasad & Hung, 2021). A pesar de que aún no conocemos en profundidad las causas por las que aparece y/o se desarrolla la EP, nuestro conocimiento sobre esta enfermedad está aumentando progresivamente (Shadrina & Slominsky, 2021; Stoker & Barker, 2020). Esto nos ha permitido identificar nuevas dianas terapéuticas para tratar la EP, así como idear nuevas estrategias para abordar los problemas que una enfermedad tan compleja como ésta nos plantea (Rai et al., 2021; Stoker & Barker, 2020).

1.7.1 Estrategias para la identificación de nuevos tratamientos

Hasta la fecha, se han seguido diferentes estrategias para conseguir el objetivo de encontrar tratamientos nuevos y más eficaces para la EP (Stoker et al., 2018; Stoker & Barker, 2020). Entre ellas, podríamos destacar las siguientes:

- La **inmunoterapia**: ésta consiste en la prevención y/o eliminación de los agregados de α -sinucleína. Para ello, se han diseñado algunos anticuerpos que promuevan la eliminación de estos agregados, así como oligonucleótidos antisentido y ARN de interferencia (Stoker & Barker, 2020) que eviten la síntesis de esta proteína. Esta estrategia está destinada a evitar los efectos adversos que la acumulación de α -sinucleína provoca en las células, como son las alteraciones en el transporte vesicular, los defectos en la autofagia, la disfunción mitocondrial, así como el aumento del EO (Balakrishnan et al., 2021; Stoker & Barker, 2020). Además, también se ha propuesto que la α -sinucleína puede actuar como un prion, lo que favorecería su diseminación a otras células (Shahnawaz et al., 2020).
- **Rastreo químico a gran escala**: la realización de rastreos a gran escala (RGE) está cobrando cada vez más importancia. Éstos permiten la evaluación de una gran cantidad de compuestos, con diversos mecanismos de acción, en modelos de la enfermedad con el objetivo de buscar posibles dianas terapéuticas y evaluar su eficacia (Aldewachi et al., 2021). De hecho, son especialmente útiles cuando no se conoce la diana terapéutica (Aldewachi et al., 2021). Normalmente, los RGE se suelen realizar en modelos celulares, evaluando la eficacia de los compuestos mediante la medición de parámetros bioquímicos. Sin embargo, los modelos generados en animales completos como el pez cebra, *C. elegans* o *Drosophila* también han sido utilizados en este tipo de rastreos (Aldewachi et al., 2021).
- El **reposicionamiento de fármacos**: esta estrategia consiste en estudiar si compuestos ya comercializados para el tratamiento de alguna enfermedad humana podrían ser beneficiosos para tratar otras enfermedades diferentes. Esta estrategia es tremendamente eficiente ya que consigue reducir considerablemente tanto los costes como el tiempo para el desarrollo de la nueva indicación. Por ejemplo, como ya se dispone de los datos de seguridad

y de farmacocinética de dichos compuestos, muchos de ellos pueden pasar directamente a la fase II de ensayos clínicos para ser evaluados en la nueva indicación (Stoker & Barker, 2020; Stott et al., 2021). Curiosamente, uno de los compuestos utilizados actualmente para tratar la EP, la amantadina, fue identificado mediante esta estrategia (Fletcher et al., 2021).

- **Búsqueda de compuestos dirigidos a neurotransmisores no dopaminérgicos:** como se ha comentado anteriormente, la terapia actual se basa en la restitución de la actividad dopaminérgica. Sin embargo, esta estrategia tiene una efectividad limitada a los síntomas motores, y solo es efectiva a corto plazo (Ahmad et al., 2022; Hauser et al., 2021; Majali et al., 2021). Además, se considera que muchos de los síntomas no motores se producen debido a alteraciones en otros neurotransmisores (Fletcher et al., 2021). Por ello, la búsqueda de compuestos dirigidos a restaurar las alteraciones presentes en esos neurotransmisores podría suponer un avance en el tratamiento de la EP (Stoker & Barker, 2020).
- **Uso de factores neurotróficos:** los factores neurotróficos son pequeñas proteínas naturales que juegan un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de las neuronas, por lo tanto, éstos podrían ser relevantes en la supervivencia de las neuronas DA (Lee & Yankee, 2021; Tomishima & Kirkeby, 2021). De hecho, se ha encontrado que el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) es necesario para el mantenimiento de las células DA nigroestriatales y de otras estructuras relacionadas con la EP (Lee & Yankee, 2021; Tomishima & Kirkeby, 2021).
- **Terapia génica:** otra de las estrategias utilizadas es la modificación genética dirigida a revertir las posibles causas por las que se está desarrollando la enfermedad (Ntetsika et al., 2021). Por ejemplo, una posibilidad consistiría en introducir los genes necesarios para la síntesis de dopamina en células nigroestriatales, lo que conduciría a un aumento de los niveles de dopamina endógena (Stoker & Barker, 2020; Tomishima & Kirkeby, 2021). Además, la introducción de genes con función neuroprotectora también podría resultar eficaz para frenar la pérdida de las neuronas DA (Tomishima & Kirkeby, 2021)
- **Células madre:** actualmente se están desarrollando muchos avances en nuestra comprensión sobre las células madre y cómo hacer uso de ellas. Las células madre nos permiten generar células DA sanas, que podrían ser reintroducidas en pacientes con la EP (Stoker & Barker, 2020), lo que conduciría a una restitución de los niveles de dopamina en el estriado. Sin embargo, el uso de células madre para recuperar el número de neuronas DA está aún en fases iniciales. De hecho, se han planteado algunos problemas que esta estrategia podría presentar, como es si estas nuevas neuronas DA podrían estar lo suficientemente reguladas para evitar una síntesis desproporcionada de dopamina, lo que agravaría las alteraciones motoras (Tomishima & Kirkeby, 2021).

1.7.2 Nuevos compuestos candidatos para tratar la enfermedad de Parkinson

A pesar de que la etiología de la EP sigue siendo un misterio, nuestro conocimiento de la enfermedad ha aumentado enormemente en los últimos años. El descubrimiento de rutas que pueden estar implicadas en la patología de la enfermedad ha permitido identificar nuevas dianas terapéuticas sobre las que actuar para poder tratar la EP (Ahmad et al., 2022; Ntetsika et al., 2021; Rai et al., 2021). El mayor reto en la búsqueda de nuevos compuestos consiste en encontrar aquellos que no se limiten a tratar los síntomas de la enfermedad, sino que sean capaces además de ralentizar o incluso detener la progresión de ésta (Ahmad et al., 2022). Por ello, se está haciendo hincapié en compuestos con mecanismos de acción neuroprotectores, antiinflamatorios o antioxidantes (Ahmad et al., 2022). Entre ellos podemos encontrar por ejemplo compuestos dirigidos a recuperar la homeostasis del Ca^{2+} , como el CDN1163 o la isradipina (Elkouzi et al., 2019; Solana-Manrique et al., 2021), la cual se encuentra alterada en la EP, promoviendo, entre otras cosas, un aumento de los niveles de estrés del RE o de la agregación de α -sinucleína, lo que conduce a la muerte celular (Groenendyk et al., 2021; Surmeier et al., 2017). Otros compuestos propuestos como candidatos son aquellos capaces de aumentar el metabolismo energético con el objetivo de potenciar la generación de ATP, que se encuentra disminuida en esta enfermedad (Cai et al., 2019; Requejo-Aguilar et al., 2015; Solana-Manrique et al., 2020). Algunos de estos compuestos son el dimetilfumurato, la meclizina o la terazosina, que aumentan la tasa glucolítica (Cai et al., 2019; Solana-Manrique et al., 2020). Por otro lado, la inflamación juega un papel importante en el desarrollo de la EP; de hecho, las neuronas son altamente susceptibles a este proceso, por lo que compuestos como la dexametasona o la minociclina, los cuales tienen actividad antiinflamatoria, han sido también propuestos como posibles terapias (Gao et al., 2003; Sanz et al., 2017). Otra diana terapéutica que ha cobrado mucha importancia en los últimos tiempos es la mitocondria, la cual parece jugar un papel clave en la patogénesis de la EP. Por ello, entre los compuestos que se están probando se encuentran algunos dirigidos a mejorar la función mitocondrial (ácido ursodesoxicólico) o a mejorar la biogénesis mitocondrial (pioglitazona) (Vijiaratnam et al., 2021). Además, cabe remarcar que los compuestos naturales también ofrecen una amplia gama de productos con diferentes mecanismos acción que han sido probados en modelos preclínicos de la EP (Sharma et al., 2022).

1.7.3 Compuestos en ensayos clínicos

Una vez los compuestos candidatos han demostrado ser efectivos en modelos preclínicos *in vivo* y/o *in vitro* de la EP, éstos pueden pasar a ser estudiados en ensayos clínicos en humanos. Los ensayos clínicos constan de diferentes fases: la fase I, en la que se analiza la seguridad y la dosis del compuesto candidato; la fase II, en la que se evalúa la eficacia y se buscan los posibles efectos adversos de dicho

compuesto; y la fase III, cuyo objetivo es estudiar la potencia del tratamiento y las posibles reacciones adversas que puedan aparecer (Maruthi Prasad & Hung, 2021). Finalmente, también hay una fase IV, en la que el compuesto suele estar ya comercializado, y es cuando se evalúa su eficacia en condiciones reales (Suvarna, 2010). Actualmente, existe una gran cantidad de compuestos que se han propuesto como potenciales tratamientos para la EP y que se encuentran incluidos en ensayos clínicos (Fig. 5) (Maruthi Prasad & Hung, 2021).

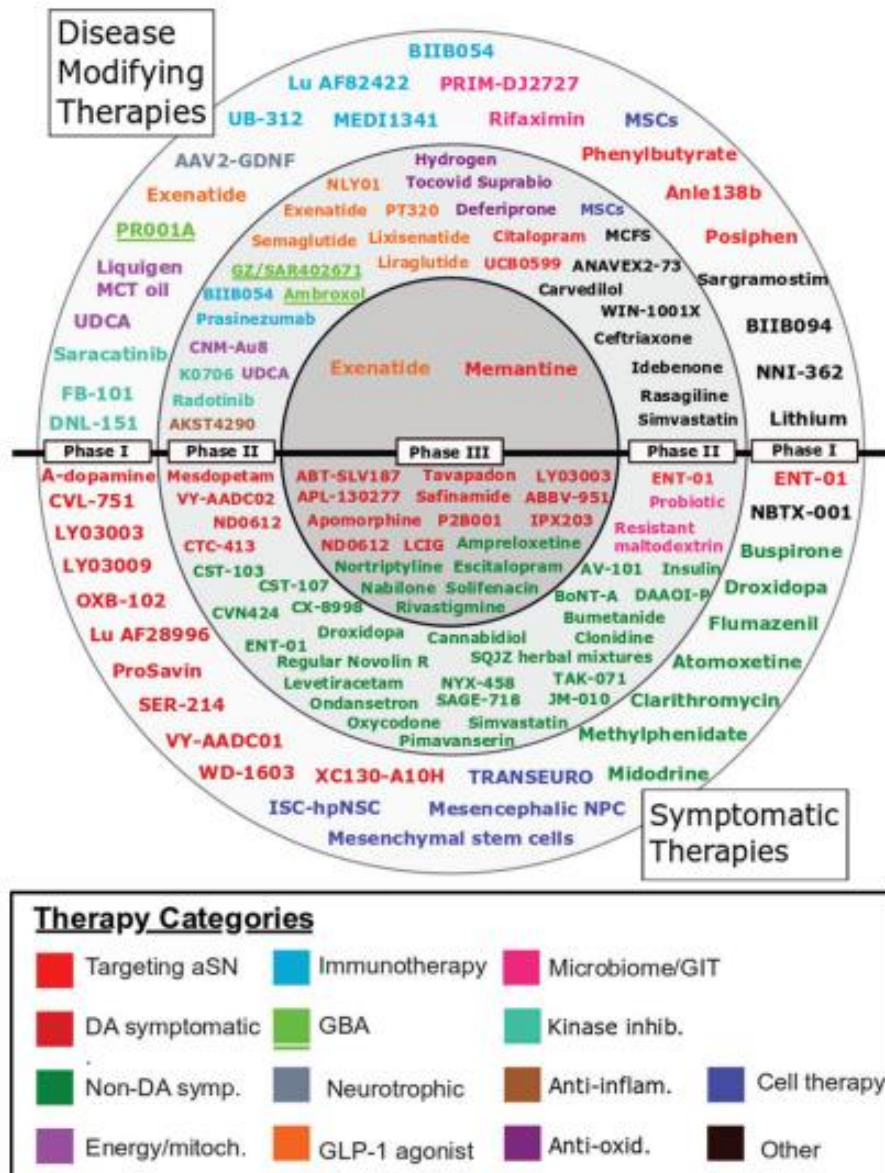


Figura 5. Resumen de los compuestos incluidos en ensayos clínicos para el tratamiento de la EP. La imagen incluye una colección de compuestos que están siendo recientemente evaluados en ensayos clínicos. Los compuestos se han separado en función de si tienen como objetivo modificar la progresión de la enfermedad (parte de arriba del círculo) o tratar los síntomas de ésta (parte de abajo del círculo). Además, los compuestos están organizados según en qué fase del ensayo clínico se encuentren: en el círculo interior están los compuestos en fase III, en el círculo medio los incluidos en fase II, y en el círculo exterior los compuestos en fase I. Asimismo, los compuestos aparecen en

diferentes colores dependiendo de su mecanismo de acción, que se muestra en el marco inferior. Imagen obtenida de McFarthing et al. (2021).

Sin embargo, la mayoría de los compuestos evaluados en los ensayos clínicos acaban fallando. Esto se puede deber a diversos factores, entre los que podemos encontrar errores en el diseño del ensayo y/o la duración del mismo, una selección inadecuada del marcador a evaluar o de los sujetos participantes en el estudio (Mahlknecht et al., 2022). Este último problema podría ser solventado en poco tiempo, ya que se están mejorando los métodos de diagnóstico, lo que llevará a poder identificar pacientes con EP en la fase prodrómica. Por lo tanto, tratamientos dirigidos a evitar alteraciones que aún sean reversibles o a reducir la pérdida de neuronas DA podrían ser más eficaces en parar o enlentecer la progresión de la enfermedad (Mahlknecht et al., 2022).

1.8. Modelos preclínicos para el estudio de la enfermedad de Parkinson

Gracias a la generación de modelos de la EP en diferentes tipos celulares y organismos, se ha conseguido avanzar en su entendimiento (Jagmag et al., 2016). Hasta la fecha, se han desarrollado diversos modelos de la EP, tanto genéticos como inducidos químicamente. Los primeros se basan en la obtención de mutantes en genes relacionados con casos de EP. Además, se han conseguido generar otros modelos de la EP gracias al uso de algunos compuestos, como la rotenona, el paraquat o la MPTP, entre otros, cuya administración conduce a una pérdida de las neuronas DA (El-Gamal et al., 2021). De hecho, estos modelos inducidos por la administración de sustancias químicas mimetizan los casos de EP (Coulom & Birman, 2004). A la hora de elegir un modelo son varios los aspectos que hay que tener en cuenta, dependiendo del objetivo del estudio que se quiera realizar. Por ejemplo, para evaluar la eficacia de compuestos es importante que el modelo reproduzca los fenotipos más característicos de los pacientes con EP, ya sean bioquímicos, fisiológicos o de comportamiento. Además, dependiendo de qué aspecto de la enfermedad se quiera estudiar (capacidad motora, habilidades cognitivas, alteraciones bioquímicas, etc.) algunos modelos pueden ser más idóneos que otros (Solana-Manrique et al., 2019).

1.8.1 Modelos celulares

Los modelos celulares son una buena elección para llevar a cabo estudios sobre la EP ya que desarrollan rápidamente las alteraciones patológicas, y la realización de ensayos genéticos y farmacológicos suele ser rápida y fiable (Koszła et al., 2021). Sin embargo, a la hora de elegir un modelo celular hay que tener en cuenta muchos factores. Entre ellos, cabría destacar el objetivo final que se pretende alcanzar y las limitaciones que presentan cada uno de ellos (Koszła et al., 2021).

Actualmente, la línea celular más utilizada para generar modelos de la EP es la línea SH-SY5Y. Las células SH-SY5Y son células de neuroblastoma humano que presentan propiedades de neuronas catecolaminérgicas. Además, son un buen

modelo para estudiar la EP ya que expresan todos los genes necesarios para sintetizar dopamina, un factor importante en esta enfermedad (Koszła et al., 2021; Xicoy et al., 2017). Por otra parte, esta línea se puede diferenciar a un tipo celular que se asemeja aún más a neuronas mediante el uso de neurotrofinas o ácido retinoico (Koszła et al., 2021). Sin embargo, el hecho de tener un origen oncológico hace que no se pueda considerar totalmente un modelo dopaminérgico (Xicoy et al., 2017). Otras líneas celulares utilizadas en el estudio de la EP, aunque en menor medida que las células SH-SY5Y, son las células LUHMES (*Lund human mesencephalic*), derivadas de tejido mesencefálico de embriones humanos, y las células PC12, provenientes de un feocromocitoma de la médula suprarrenal de rata (Grau & Greene, 2012; Koszła et al., 2021).

Otras células que se utilizan como modelo para la EP, y que están adquiriendo mucha importancia en los últimos años, son las neuronas DA derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Las iPSC pueden obtenerse fácilmente a partir de células somáticas, como los fibroblastos (Avazzadeh et al., 2021; Koszła et al., 2021). Esto permite poder trabajar con neuronas DA que proceden directamente de pacientes con EP, y por lo tanto reproducen fielmente su fondo genético (Avazzadeh et al., 2021). Estudios realizados con estas células han demostrado que presentan muchos de los fenotipos encontrados en neuronas DA de pacientes con EP, como son alteraciones morfológicas y de la función de la mitocondria, una reducción de la actividad de la ATP sintasa y un aumento de los niveles de ROS (Avazzadeh et al., 2021).

1.8.2 Modelos invertebrados

Drosophila es un organismo muy versátil para el estudio de EN ya que presenta un SNC bien definido, una barrera hematoencefálica (BHE) desarrollada, y utiliza vías de señalización y neurotransmisores muy similares a los de humanos (Sanz et al., 2021). Además, se estima que aproximadamente el 75 % de los genes causantes de enfermedades genéticas en humanos se conservan en moscas (Aryal & Lee, 2019). Esto permite que se puedan generar modelos de la gran mayoría de EN conocidas. Entre sus ventajas se encuentra que en este organismo existen una gran cantidad de técnicas para generar mutantes, tanto de ganancia como de pérdida de función. Cabe destacar el uso del sistema binario GAL4/UAS de levadura, de los elementos transponibles, y más recientemente del sistema *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/CRISPR associated system* (CRISPR/Cas). Por otro lado, *Drosophila* se ha convertido en un modelo muy adecuado para el estudio de la EP ya que se pueden realizar una gran cantidad de ensayos. Éstos permiten analizar alteraciones bioquímicas, cambios en el comportamiento (como puede ser la actividad locomotora, el cortejo, el apareamiento, la agresividad, etc.) o la existencia de neurodegeneración, entre otros (Solana-Manrique et al., 2019). Además, debido a su corto ciclo de vida se pueden estudiar individuos en diferentes estadios de la enfermedad, tanto tempranos como tardíos (Shadrina & Slominsky, 2021)

El nematodo *C. elegans* también es un modelo muy útil para el estudio de la EP. Al igual que *Drosophila*, *C. elegans* presenta un ciclo de vida corto, es fácilmente manipulable, produce una abundante descendencia, y presenta una importante homología con humanos a nivel genómico y de rutas de señalización (Shadrina & Slominsky, 2021). Además, en *C. elegans* también se dispone de multitud de técnicas que permiten el estudio de muchas alteraciones características de la EP, como son la muerte de neuronas DA, las alteraciones mitocondriales y los defectos motores (Cooper & van Raamsdonk, 2018).

1.8.3 Modelos de mamíferos

Los modelos mamíferos más utilizados para el estudio de la EP son los desarrollados en roedores. Esto se debe a su mayor cercanía a humanos, a que su mantenimiento en el laboratorio es fácil, a que existen multitud de ensayos para medir de una manera eficaz la actividad locomotora y otros parámetros relacionados con el comportamiento, y a que se pueden utilizar vías de administración de compuestos similares a las de humanos (Konnova & Swanberg, 2018). Sin embargo, también presentan limitaciones ya que, hasta la fecha, no se ha podido obtener un modelo de la EP en roedores que consiga reproducir todos los fenotipos de los pacientes que sufren la enfermedad (Antony et al., 2011; Konnova & Swanberg, 2018). Además de los modelos de ratón y rata, se han desarrollado otros en minicerdos para el estudio de la EP. Entre las ventajas de este organismo destaca que su estructura cerebral es muy similar a la de humanos, y que presenta un tamaño mayor de la SNpc y del estriado que los roedores, lo que facilita la realización de operaciones estereotáxicas o el análisis de estructuras cerebrales mediante el uso de la PET (Shadrina & Slominsky, 2021).

1.9. La proteína DJ-1

La proteína DJ-1 fue inicialmente descrita en 1997 como el producto de un oncogén relacionado con la ruta de señalización de la quinasa Ras/MAP (Buneeva & Medvedev, 2021; Dolgacheva et al., 2019). Posteriormente, en 2003 se descubrieron mutaciones en el gen *DJ-1* que estaban implicadas en el desarrollo de formas autosómicas recesivas de la EP de aparición temprana (Bonifati et al., 2003). Sin embargo, alteraciones en *DJ-1* también se han relacionado con otras enfermedades, como pueden ser la Diabetes Mellitus (DM), la infertilidad masculina o enfermedades cerebrovasculares (Zhang et al., 2020).

La proteína DJ-1 está compuesta por 189 aminoácidos que contiene ocho hélices α y once hojas β , y en condiciones fisiológicas se encuentra en forma dimérica (Fig. 6) (Ramsey & Giasson, 2010). Las mutaciones en el gen *DJ-1* pueden producir formas que impidan la dimerización de la proteína, o que afecten a su estabilidad o plegamiento, lo que conduce a una disminución de su actividad o incluso a su completa inactivación (Buneeva & Medvedev, 2021). Hasta la fecha, se han descrito alrededor de 20 mutaciones diferentes asociadas con la EP, siendo la mutación L166P, en la que se produce la sustitución de la prolina situada en posición 166 por

una leucina, la que tiene un efecto más devastador (Buneeva & Medvedev, 2021). La proteína DJ-1 presenta tres residuos de cisteína en su secuencia (Cys46, Cys53 y Cys106), siendo el situado en posición 106 el más importante para su función. Este residuo, en condiciones de EO, se puede oxidar sucesivamente a ácido sulfénico (SOH), ácido sulfinico (SO₂H) y finalmente a ácido sulfónico (SO₃H) (Buneeva & Medvedev, 2021; Dolgacheva et al., 2019). La oxidación de este residuo de cisteína conduce a la activación de la proteína; sin embargo, una sobreoxidación del mismo llega a producir cambios en la estructura secundaria de la proteína e incluso conducir a su inactivación (Buneeva & Medvedev, 2021; Huang & Chen, 2021). Curiosamente, se han encontrado formas sobreoxidadas de esta proteína en cerebros de pacientes con EPe, lo que sugiere que la falta de función de DJ-1 también podría estar implicada en la patología de los casos esporádicos (Ariga et al., 2013; Dolgacheva et al., 2019). Por otra parte, la proteína DJ-1 también puede activarse mediante la sumoilación de su residuo de lisina situado en posición 130 (Buneeva & Medvedev, 2021). DJ-1 se encuentra principalmente en el citoplasma, pero tras su activación se dirige al interior del núcleo y de la mitocondria (Dolgacheva et al., 2019). Una vez localizada en la mitocondria, DJ-1 interacciona con la *nicotinamide adenine dinucleotide* (NADH) deshidrogenasa, estabilizando la función del complejo I de la CTE. Además, también se ha encontrado formando un complejo con la subunidad β de la ATP sintasa, lo que aumenta la producción de ATP y reduce la fuga de electrones, disminuyéndose así la formación de ROS (Buneeva & Medvedev, 2021; Dolgacheva et al., 2019). Por otro lado, DJ-1 entra en el núcleo en forma de monómero y actúa como regulador transcripcional de varios genes, entre los que se incluyen algunos con función neuroprotectora, como *p53* o genes de la ruta PI3K (*phosphatidylinositol 3 kinase*)/PKB (*protein kinase B*), así como otros responsables de la defensa frente al EO como *nrf2* (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) o *SOD* (superóxido dismutasa) (Buneeva & Medvedev, 2021). Además, la proteína DJ-1 también presenta actividad antioxidante por ella misma, ya que es capaz de eliminar ROS mediante su autooxidación (Huang & Chen, 2021). Asimismo, también es capaz de estabilizar la función de la proteína antioxidante Nrf2, evitando su interacción con la proteína Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), lo que conduce a su inactivación (Dolgacheva et al., 2019).

Además de las funciones ya mencionadas, DJ-1 presenta muchas otras que pueden estar relacionadas con la patología de la EP. Por ejemplo, se ha visto que esta proteína tiene también actividad deglicasa, a través de la que DJ-1 puede reducir los niveles de glicación de proteínas (Buneeva & Medvedev, 2021). De hecho, se ha encontrado que en modelos de la EP hay un aumento de los niveles de metilglioxal, un subproducto de la glucólisis, que es capaz de producir la glicación de proteínas, lo que puede conducir a su agregación (Mencke et al., 2021). También se ha encontrado recientemente que DJ-1 juega un papel importante en diferentes rutas metabólicas. Resultados obtenidos por nuestro grupo han confirmado que la falta de función de *DJ-1* produce un aumento de la glucólisis y una reducción de la actividad de algunos enzimas del ciclo del ácido cítrico (CAC) (Solana-Manrique et

al., 2020, 2022). Además, hemos encontrado que las moscas mutantes para este gen presentan alteraciones adicionales en su perfil metabolómico en comparación con moscas control (Solana-Manrique et al., 2022). Por otro lado, también se ha descrito que DJ-1 juega un papel importante en otros procesos como la autofagia mediada por chaperonas (Dolgacheva et al., 2019). La figura 7 muestra un resumen de las funciones más importantes de la proteína DJ-1, muchas de las cuales pueden estar implicadas en la patología de la EP.

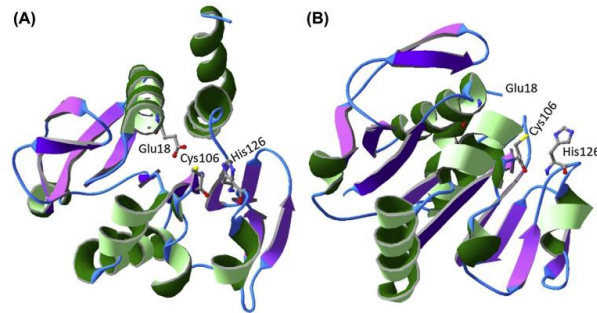


Figura 6. Estructura cristalina de la proteína DJ-1. La imagen muestra la estructura 3D de la proteína DJ-1 en dos orientaciones distintas (A-B). Las hélices α se muestran en verde y las hojas β en morado. Además, la imagen también destaca algunos de los aminoácidos más importantes de la proteína, como la cisteína 106, la cual es imprescindible para su actividad. Imagen obtenida de Musco et al. (2020).

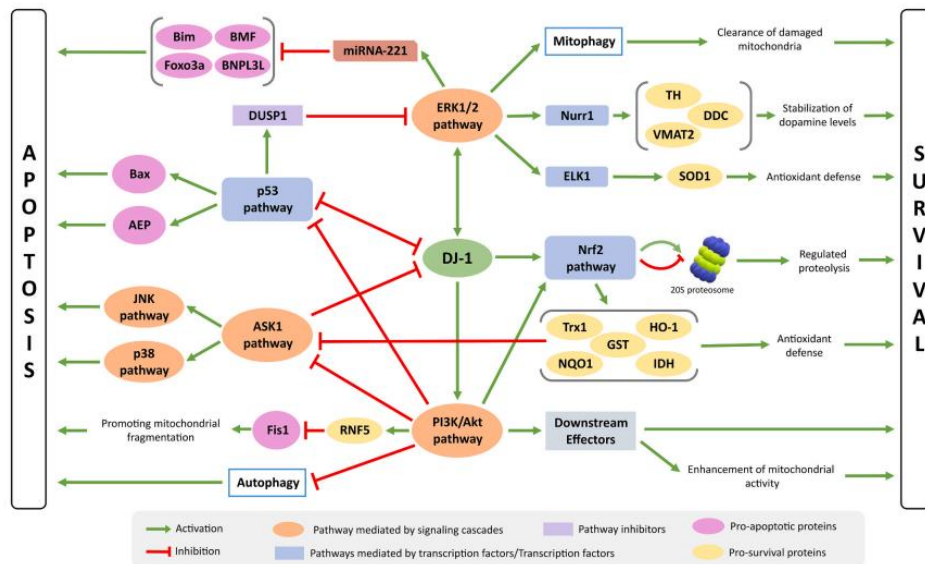


Figura 7. Resumen de las funciones más importantes de la proteína DJ-1. Representación de los mecanismos que pueden estar implicados en la aparición de la EP debido a la falta de función del gen *DJ-1*. Entre ellos destaca la implicación de la proteína DJ-1 en procesos como la defensa frente al EO, la regulación de la proteólisis y la autofagia, la homeostasis mitocondrial y su interacción con vías de señalización que están relacionadas con la apoptosis. Imagen obtenida de Neves et al. (2022).

Curiosamente, se ha descubierto que la proteína DJ-1 puede actuar junto con las proteínas PINK1 (*PTEN Induced Putative Kinase 1*) y parkin (*E3 ubiquitin protein ligase*), las cuales también han sido descritas como causantes de formas autosómicas recesivas de EPf (Trempe & Fon, 2013). PINK1 es una proteína que se encuentra en la membrana externa mitocondrial con actividad quinasa (Salazar et al., 2018). Parkin (park), por su parte, es una proteína que se encuentra en el citoplasma y que forma parte del sistema ubiquitina-proteasoma (Salazar et al., 2018). Cuando hay una reducción del potencial de membrana mitocondrial, la proteína PINK1 se acumula en la membrana externa de la mitocondria y recluta a la proteína park, la cual es fosforilada, promoviéndose así la mitofagia (Quinn et al., 2020). La proteína DJ-1 está relacionada con esta vía ya que se ha demostrado que su sobreexpresión es capaz de atenuar los fenotipos mostrados por moscas mutantes para el gen *PINK1*, aunque no en los mutantes *park*, lo que sugiere que DJ-1 podría actuar por debajo, o en paralelo de PINK1 (Hao et al., 2010). Además, también se ha visto que las proteínas DJ-1, PINK1 y park son capaces de formar un complejo con actividad ubiquitin-ligasa E3 encargado de promover la degradación de proteínas mal plegadas (Xiong et al., 2009).

1.10. Mutantes *DJ-1 β* en *Drosophila* como modelo de la enfermedad de Parkinson

El gen *DJ-1* humano presenta dos ortólogos en *Drosophila*, *DJ-1 α* y *DJ-1 β* . Sin embargo, se considera que el gen *DJ-1 β* es funcionalmente equivalente al gen *DJ-1* ya que presenta un patrón de expresión ubicuo en los diferentes estadios del desarrollo (Lavara-Culebras & Paricio, 2007; Park et al., 2005), al igual que el humano. Además, la proteína DJ-1 β de *Drosophila* tiene las mismas funciones bioquímicas que la proteína DJ-1 humana, así como una activación dependiente de un residuo de cisteína (Meulener et al., 2005). Sin embargo el gen *DJ-1 α* se expresa principalmente en testículos (Lavara-Culebras & Paricio, 2007; Park et al., 2005).

Hasta la fecha, se han generado varios modelos de la EP basados en la pérdida de función de *DJ-1 β* , utilizándose diferentes estrategias para ello. Entre ellos podríamos destacar los mutantes *DJ-1 β ^{ex54}* y *DJ-1 β ^{A286}* (Lavara-Culebras & Paricio, 2007; Park et al., 2005). El mutante *DJ-1 β ^{ex54}* se generó por escisión imprecisa de un elemento P, que provocó una delección de aproximadamente 450 pb en el gen. Estas moscas eran viables y fértiles y presentaban algunos fenotipos característicos de la EP. Por ejemplo, las moscas *DJ-1 β ^{ex54}* exhibían defectos locomotores desde el primer día tras la eclosión en comparación con moscas control. Además, estos defectos locomotores se acrecentaron al tratar las moscas con paraquat, un compuesto que induce EO. Sin embargo, este modelo no presentaba ni pérdida de neuronas DA ni presencia de cuerpos de Lewy (Park et al., 2005). Estudios posteriores demostraron que estas moscas sí presentan degeneración de neuronas DA cuando se cultivaban en presencia de compuestos que inducen un aumento de EO (Hwang et al., 2013). Por otro lado, los mutantes *DJ-1 β ^{A286}* se generaron mediante la inserción de un elemento PiggyBac en el tercer exón del gen *DJ-1 β* , lo que producía una versión

truncada e inactiva de la proteína (Lavara-Culebras & Paricio, 2007). Estas moscas eran también fértiles y viables, y presentaban defectos locomotores desde el primer día tras la eclosión. Además, estas moscas presentaban una esperanza de vida reducida y eran más sensibles a condiciones de elevado EO. Al igual que las moscas *DJ-1^{β^{ex54}}*, los mutantes *DJ-1^{β^{A286}}* de 1 y de 30 días de edad tampoco presentaban pérdida de neuronas DA (Lavara-Culebras & Paricio, 2007). Posteriormente, también se demostró que estas moscas mostraban niveles elevados de ROS y de proteínas carboniladas en comparación con moscas control (Casani et al., 2013).

En general, todos los mutantes *DJ-1^β* generados hasta la fecha comparten los mismos fenotipos, como son los defectos locomotores, el aumento de los niveles de ROS y la hipersensibilidad a condiciones de elevado EO (Casani et al., 2013; Lavara-Culebras & Paricio, 2007; Meulener et al., 2005; Park et al., 2005). Por lo tanto, estas moscas son capaces de reproducir gran parte de las alteraciones presentes en pacientes con EP, lo que las ha convertido en un excelente modelo para estudiar esta enfermedad. De hecho, estudios realizados con estos mutantes han permitido identificar posibles rutas relacionadas con la patología de la enfermedad (Fernandez-Ayala et al., 2009; Hwang et al., 2013; Kim et al., 2018; Vos & Klein, 2021; Yang et al., 2017). Además, estas moscas modelo han sido también utilizadas con el objetivo de identificar y evaluar la eficacia de compuestos candidatos para la EP, como se explicará más en detalle en el apartado siguiente.

1.10.1 Uso de *Drosophila* en la identificación de compuestos terapéuticos para la enfermedad de Parkinson

Debido a que los modelos de *Drosophila* reproducen gran parte de los fenotipos característicos de la EP, se han convertido en herramientas excelentes en la identificación de nuevos compuestos candidatos para tratar la enfermedad (Sanz et al., 2017, 2021; Solana-Manrique et al., 2019). La EP se caracteriza principalmente por la manifestación de los síntomas motores (Mahmood et al., 2021). Las alteraciones motoras también están presentes en las moscas mutantes *DJ-1^β*, y son fácilmente cuantificables mediante la realización de ensayos de escalada. Utilizando este método, nuestro grupo llevó a cabo un rastreo piloto en el que se evaluó la capacidad de diferentes compuestos, que presentaban actividades antioxidantes, neuroprotectoras o antiinflamatorias, de mejorar la actividad motora de las moscas mutantes. Este ensayo permitió identificar siete compuestos (dexrazoxano, pterostilbene, tocoferol, fenilbutirato de sodio, dalfampridina, azul de metileno y minociclina), cuya eficacia fue luego confirmada en un modelo celular humano de la EP (Sanz et al., 2017). Otra estrategia utilizada en la búsqueda de nuevos compuestos para tratar la EP es descubrir alteraciones relacionadas con la aparición de la EP, e identificar compuestos dirigidos a suprimir dichas alteraciones y evaluar su eficacia. Por ejemplo, nuestro grupo realizó un ensayo de proteómica REDOX en el que se identificaron dos posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de la EP, la glucólisis y la proteína SERCA (*sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase*). Tras esto, se seleccionaron tres compuestos: la meclizina y el dimetilfumarato

(compuestos que aumentan la tasa glucolítica), y el CDN1163 (un compuesto que aumenta la actividad de SERCA). Los resultados demostraron que estos tres compuestos eran capaces de mejorar la actividad locomotora y de reducir los niveles de EO en las moscas mutantes *DJ-1 β* (Solana-Manrique et al., 2020, 2021), confirmándose así su potencial terapéutico.

Otra estrategia utilizada en la búsqueda de nuevos compuestos terapéuticos para tratar la EP es el estudio de sustancias naturales. En este sentido, algunos compuestos y extractos de plantas han sido propuestos como candidatos. Por ejemplo, se ha encontrado que el *epigallocatechin-3-gallate* (un polihidroxifenol del té verde), es capaz de mejorar la actividad motora y la esperanza de vida de moscas en las que el gen *DJ-1 β* ha sido silenciado en neuronas DA (Martinez-Perez et al., 2018). Además, las moscas tratadas con este compuesto presentaban una reducción de la peroxidación lipídica, un marcador de EO (Martinez-Perez et al., 2018). Otro producto estudiado fue el amalaki rasayana, una preparación tradicional india obtenida de los frutos de *Phyllanthus emblica* o *Embilica officinalis*. El tratamiento de moscas mutantes *DJ-1 β* de 35 días de edad con estos compuestos produjo un incremento de su esperanza de vida y aumentó la actividad de la proteína SOD (una enzima con actividad antioxidante) (Dwivedi & Lakhotia, 2016). La espirulina, una cianobacteria que se utiliza como fuente alimenticia, también se ha propuesto como tratamiento de la EP. El tratamiento de mutantes *DJ-1 β* tanto con espirulina como con *C-phycoyanin* (un compuesto activo de la espirulina) consiguió mejorar la actividad motora, la esperanza de vida y reducir la actividad catalasa (lo que se relaciona con una reducción de los niveles de EO) en esas moscas modelo de la EP. Además, también fueron capaces de reducir los niveles de Hsp70 y de p-JNK, dos proteínas cuyos niveles se encuentran elevados en condiciones de estrés celular (Dwivedi & Lakhotia, 2016). Por último, otro compuesto natural que también se ha estudiado utilizando este modelo de *Drosophila* es el *omija* (*Schisandra chinensis*), que consiguió mejorar las propiedades cognitivas de moscas *DJ-1 β* tras 8-10 días de tratamiento (Poudel & Lee, 2018).

2. Diabetes Mellitus

La DM es una de las enfermedades más antiguas conocidas por el hombre (Tan et al., 2019). Esta enfermedad es un desorden metabólico crónico caracterizado por un aumento de los niveles de glucosa en sangre, el cual se produce a causa de una desregulación de la insulina (Animaw & Seyoum, 2017; Tan et al., 2019). La insulina es una hormona sintetizada por el páncreas en respuesta a niveles elevados de glucosa en sangre y que, entre varias funciones, destaca por su actividad hipoglucemiante (Sorriento et al., 2021). La insulina se sintetiza y se excreta en las células β pancreáticas, y se encarga de facilitar la entrada de la glucosa a las células con el objetivo de ser utilizada para la producción de energía (Tan et al., 2019). La DM se produce tanto por una reducción en la síntesis de la insulina, como por la aparición de resistencia a ésta (Deshmukh & Jain, 2015). El diagnóstico de la enfermedad se realiza mediante la medición de los niveles de glucosa en plasma o

de la hemoglobina A1c (HbA1c). Más en concreto, se considera que se padece la enfermedad cuando el nivel de glucosa en plasma en ayuno es superior a 126 mg/dl, cuando es mayor de 200 mg/dl a las 2 h de ser sometido a una sobrecarga oral de glucosa, o si es mayor de 200 mg/dl en un muestreo aleatorio, pero con síntomas de hiperglucemia. Además, también se utiliza para diagnosticar la DM una concentración mayor al 6,5% de HbA1c (Kharroubi, 2015).

Esta enfermedad afecta a diferentes células y tejidos del organismo, siendo los eritrocitos, el riñón, los ojos, el corazón o las neuronas algunos de los más perjudicados (Deshmukh & Jain, 2015). Además, la DM incrementa el riesgo de sufrir complicaciones, como enfermedades cardiovasculares, ictus, neuropatías, nefropatías, ceguera, fallo renal o amputaciones, entre otras (Deshmukh & Jain, 2015). Actualmente, la prevalencia de esta enfermedad está aumentando en todos los países del mundo, lo que provoca un problema socioeconómico importante a todos los niveles (Tan et al., 2019). De hecho, la prevalencia en 2019 era del 9,3% (463 millones de personas), y se estima que aumentará hasta el 10,9% en 2045 (700 millones de personas). Además, esta enfermedad se encuentra entre las diez causas más frecuentes de mortalidad en adultos (Saeedi et al., 2019).

2.1. Tipos de Diabetes Mellitus

La DM se puede clasificar en gran cantidad de tipos, siendo los más comunes la DM tipo 1 (DMT1) y la DM tipo 2 (DMT2). La DMT1 se produce principalmente por una reducción en los niveles de insulina debido a una destrucción de las células β -pancreáticas a través de procesos autoinmunes mediados por células T (Tan et al., 2019). En cambio, la DMT2 se produce por la aparición de resistencia a la insulina y por una reducción de sus niveles a largo plazo (Deshmukh & Jain, 2015; Tan et al., 2019).

La DMT1 es más común en niños, y sus causas suelen ser genéticas. Sin embargo, también existen factores ambientales que pueden suponer un riesgo de padecer la enfermedad, como son las infecciones virales, los niveles reducidos de vitamina D o la baja exposición a los rayos UV. Además, otros factores como la obesidad infantil, la maternidad en edades avanzadas o una corta duración de la lactancia materna se han asociado a un mayor riesgo de desarrollar la DMT1 (Saeedi et al., 2019; Tan et al., 2019). En cuanto a la DMT2, suele aparecer sobre todo en la población adulta y con obesidad, aunque también puede aparecer durante la infancia (Saeedi et al., 2019; Tan et al., 2019). La DMT2 es la forma de diabetes más común, suponiendo aproximadamente el 90% de los casos (Reed et al., 2021; Saeedi et al., 2019). Aunque hay factores genéticos implicados en la aparición de la DMT2, ésta se produce principalmente por la ingesta de comidas con altos niveles de carbohidratos y de bebidas azucaradas, así como por llevar un estilo de vida sedentario (Animaw & Seyoum, 2017; Tan et al., 2019). La falta de actividad física conduce a una disminución en los requerimientos de glucosa, lo que puede conducir al desarrollo de obesidad y a sufrir la DMT2 (Tan et al., 2019). Además, el envejecimiento también se ha considerado como un factor de riesgo de padecer esta

enfermedad (Saeedi et al., 2019). Cabe mencionar que recientemente se ha encontrado una relación entre la EA y la DM. La EA se caracteriza por la formación de agregados del péptido β -amiloide y las proteínas tau que, entre otros efectos adversos, pueden provocar la aparición de resistencia a insulina. Además, se ha visto que ambas enfermedades comparten diferentes fenotipos, como el aumento de los niveles de EO, las alteraciones mitocondriales, un aumento de los procesos inflamatorios, etc. Esto ha hecho que se haya propuesto que la EA es una forma específica cerebral de DM y que se considere como la DM tipo 3 (Michailidis et al., 2022). Por otra parte, la DMT2 se ha propuesto también como un factor de riesgo de padecer la EP (Reed et al., 2021).

2.2. Ruta de señalización de la insulina y su implicación en el sistema nervioso central

La ruta de señalización de la insulina (RSI) es una ruta bioquímica que se inicia tras la unión de la insulina su receptor. Esta unión produce una reacción en cascada que conduce a la activación de dos vías de señalización diferentes. La primera es la ruta de las MAPK (*mitogen-activated protein kinases*), que está relacionada con funciones de crecimiento y desarrollo. La segunda es la vía de PI3K (*phosphatidylinositol 3 kinase*), que activa la ruta AKT/PKB (*protein kinase B*), la cual está relacionada con funciones metabólicas (Fig. 8) (Świdarska et al., 2020). La insulina ejerce su función metabólica principalmente en tres órganos (el hígado, el tejido adiposo y el músculo esquelético), induciendo en cada uno de ellos diferentes respuestas, aunque todas ellas dirigidas a reducir los niveles de glucosa en sangre (Sorriento et al., 2021).

Sin embargo, la insulina también ejerce otras funciones diferentes a las metabólicas, y tiene influencia en otras partes del organismo, como es el caso del SNC (Biosa et al., 2017). La insulina entra en el SNC a través de proteínas transportadoras, ya que es incapaz de atravesar la BHE (Chomova, 2022; Sorriento et al., 2021), aunque también se ha descrito que puede ser sintetizada en el SNC, pero en menor medida (de Iuliis et al., 2022). Una vez allí, aparte de su función metabólica, la insulina ejerce otras muchas funciones implicadas en la homeostasis de las neuronas, como son la regulación de la plasticidad neuronal, a través tanto de la recaptación, liberación y degradación de neurotransmisores como la noradrenalina y la dopamina, o la regulación de la actividad de receptores postsinápticos (Fiory et al., 2019; Gralle, 2017). Además, también se ha descrito que juega un papel importante en la homeostasis mitocondrial (Chomova, 2022). De hecho, se ha visto que en presencia de resistencia a insulina se producen alteraciones mitocondriales. Más en concreto, algunos estudios sobre la DM han encontrado alteraciones en la CTE, en el metabolismo energético y en los procesos de fusión y fisión mitocondrial asociados con la enfermedad (Chomova, 2022). Todo esto sugiere que las alteraciones en la RSI y la presencia de resistencia a insulina ejercen un papel perjudicial en el cerebro a todos los niveles. Por ejemplo, se ha visto que los pacientes con DM presentan una reducción del volumen del hipocampo y de la región prefrontal, un incremento de la atrofia cerebral global y una disminución

del volumen de la materia blanca en el lóbulo temporal. Además, también se manifiestan alteraciones a nivel bioquímico, encontrándose trastornos en los niveles de N-acetil aspartato, glutamato, mio-inositol y colina, que pueden ir asociados con defectos cognitivos (Chomova, 2022).

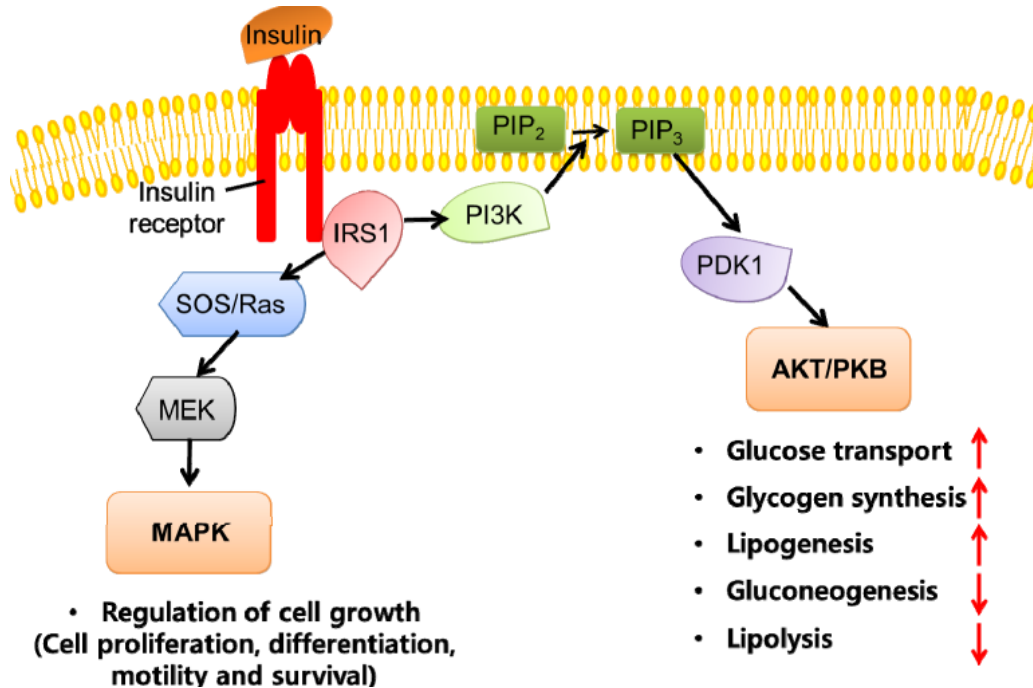


Figura 8. Ruta de señalización de la insulina. La imagen muestra una representación de las diferentes vías que actúan por debajo de la RSI. A la izquierda aparece la ruta de las MAPK, cuyas funciones están relacionadas con la regulación del crecimiento y desarrollo. A la derecha se encuentra la vía de PI3K, relacionada con el control del metabolismo, entre cuyas funciones destacan el aumento del transporte de glucosa, la síntesis de glucógeno y la lipogénesis, y la reducción de la gluconeogénesis y la lipólisis. Imagen obtenida de Jung & Choi, (2014).

2.3. Relación de la Diabetes Mellitus con la enfermedad de Parkinson

Debido al importante papel que juega la insulina en el SNC, y de las alteraciones que provoca la DM a este nivel, se ha propuesto que padecer esta enfermedad puede favorecer la aparición de neurodegeneración (Fiory et al., 2019). Como se ha comentado en el apartado 2.1, la EA se ha llegado a considerar incluso como un nuevo tipo de DM (Michailidis et al., 2022). En este escenario, se han realizado varios estudios epidemiológicos con el objetivo de dilucidar si existe alguna relación entre la EP y la DM, especialmente con la DMT2 (de Iuliis et al., 2022; Fiory et al., 2019). La mayoría de ellos han llegado a la conclusión de que la DMT2 puede suponer un factor de riesgo de padecer la EP; sin embargo, otros estudios han mostrado resultados contradictorios (Cheong et al., 2020; Fiory et al., 2019). Además, también se ha encontrado que los pacientes con la EP que sufren DMT2 presentan un empeoramiento de los síntomas motores y cognitivos (de Iuliis et al., 2022).

Hasta la fecha, se han realizado diversos estudios con el fin de evaluar si la DMT2 pudiera ser la causa de la aparición de alteraciones que llevaran al desarrollo de la EP (Fiory et al., 2019). Por ejemplo, el aumento de los niveles de EO parece jugar un papel fundamental en la EP (Poewe et al., 2017). Se ha descrito que la hiperglucemia puede producir un aumento de los niveles de EO mediante la saturación de la ruta de los polioles, lo que disminuye la producción de glutatión, una molécula clave en la defensa frente al EO (de Iuliis et al., 2022). Además, se ha demostrado que la hiperglucemia produce alteraciones mitocondriales que conducen a un aumento de los niveles de superóxido (de Iuliis et al., 2022), así como a un aumento de los niveles de metilglioxal, el cual está implicado en la formación de agregados proteicos, como pueden ser los cuerpos de Lewy (de Iuliis et al., 2022).

Otra de las razones por las que se considera que la DMT2 es un factor de riesgo de sufrir la EP es que la insulina parece tener un efecto neuroprotector. Estudios recientes han demostrado que la insulina es capaz de reducir la degeneración de neuronas y células gliales tras ser sometidas a EO por la acción de H₂O₂. Además, estos autores también encontraron que la insulina ejercía un papel protector en estas células tras ser tratadas con MPTP, un compuesto que induce un aumento de los niveles de EO y que se utiliza para generar modelos de la EPE. Asimismo, también se ha demostrado que la insulina es capaz de reducir los defectos motores y la pérdida de neuronas DA en la SNpc en un modelo de la EP en rata (Ramalingam & Kim, 2016a, 2016b). Por otra parte, la insulina ejerce un efecto inhibitorio de la actividad de la glucógeno-sintasa quinasa 3 (GSK-3), cuya desregulación se ha asociado a la aparición de los cuerpos de Lewy (de Iuliis et al., 2022). Es más, la RSI también está relacionada con dos proteínas, α -sinucleína y LRRK2, ambas codificadas por genes cuyas mutaciones son causantes de casos de EPf (Hong et al., 2020).

2.4. Modelos de Diabetes Mellitus en *Drosophila*

Drosophila se ha convertido en un excelente modelo para el estudio de la DM ya que presenta una homeostasis de los niveles de carbohidratos muy similar a la de humanos (Graham & Pick, 2017). Además, también la regulación de estos niveles se lleva a cabo por la acción de proteínas muy similares a la insulina, llamadas *insulin-like peptides* (ILPs), las cuales actúan a través de la RSI (Graham & Pick, 2017). *Drosophila* expresa ocho *Ilps* diferentes, cuyas funciones parecen ser redundantes (Graham & Pick, 2017), aunque se considera que ILP2, ILP3 y ILP5 son las proteínas que ejercen un papel más importante en el mantenimiento de la homeostasis de los hidratos de carbono (Gáliková & Klepsatel, 2018). Estas ILPs son sintetizadas en *Drosophila* en el cerebro en unas células que se denominan *insulin-producing cells* (IPC) (Graham & Pick, 2017). Estas similitudes han permitido la generación de moscas modelo tanto de la DMT1 como de la DMT2.

Los modelos de la DMT1 se han generado siguiendo las siguientes estrategias:

- Uso del sistema UAS-GAL4, mediante el que se expresa la proteína proapoptótica Reaper bajo el control del promotor del gen *Ilp2*. Esto hace que la proteína Reaper se exprese en las IPC, lo que conduce a la muerte de estas células (Broughton et al., 2005).
- Tratamiento de moscas salvajes con diclorvos (2,2-diclorovinil-dimetil fosfato), un compuesto con actividad pesticida (Gupta et al., 2019).
- Generación de líneas de *Drosophila* mutantes para los genes que codifican las ILPs (Zhang et al., 2009).

Los modelos de la DMT2 se han generado siguiendo las siguientes estrategias:

- Cultivo de moscas salvajes en un medio hipercalórico, ya sea incrementando los niveles de hidratos de carbono, de lípidos o de proteínas (Morris et al., 2012).
- Generación de líneas de *Drosophila* mutantes para los genes que codifican componentes de la RSI, como son *Glut1*, *chico* o *PI3K* (Graham & Pick, 2017).
- Tratamiento de moscas salvajes con atrazina, un compuesto con actividad herbicida (Gupta et al., 2019).

2.5. Reposicionamiento de fármacos antidiabéticos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson

Teniendo en cuenta que la DM puede suponer un factor de riesgo en el desarrollo de la EP, y que ambas enfermedades comparten múltiples fenotipos, es comprensible pensar que los fármacos antidiabéticos podrían ser efectivos también en el tratamiento de la EP (Labandeira et al., 2022). Confirmando esta hipótesis, un estudio epidemiológico demostró que los pacientes diabéticos que no tomaban ningún tratamiento presentaban un mayor riesgo de padecer la EP (Brauer et al., 2020).

Hasta la fecha, se han realizado diversos estudios para evaluar la posible eficacia de algunos de esos compuestos sobre la EP. Además, también se han analizado los posibles mecanismos por los que podrían estar ejerciendo una función neuroprotectora (Fig. 9) (Sharma et al., 2022). Entre los antidiabéticos más estudiados, podemos encontrar los inhibidores de DPP-4 (dipeptidil-peptidasa 4), los análogos de GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*), la bromocriptina, o la metformina (Labandeira et al., 2022; Sharma et al., 2022). De hecho, algunos de ellos ya se encuentran incluidos en ensayos clínicos, como pueden ser la exenatida o la liraglutida (Maruthi Prasad & Hung, 2021).

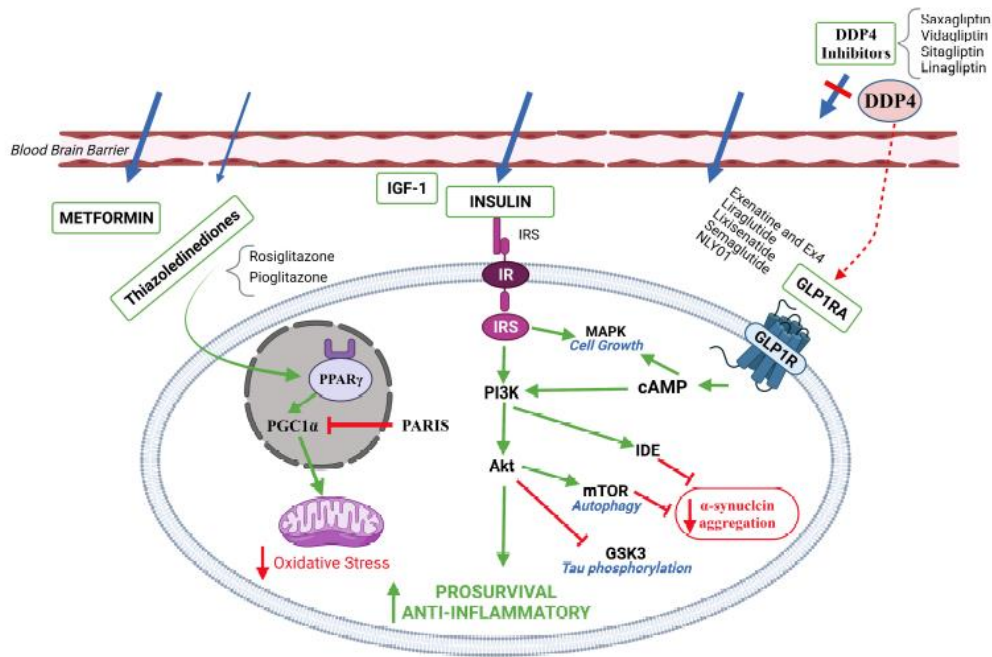


Figura 9. Dianas terapéuticas de fármacos antidiabéticos relacionadas con la enfermedad de Parkinson. La imagen muestra un resumen de los fármacos antidiabéticos que se han propuesto como tratamientos potenciales para la EP, y la diana terapéutica sobre la que actúan. Imagen obtenida de Labandeira et al. (2022).

OBJETIVOS

En los últimos años, nuestro conocimiento sobre la EP ha avanzado considerablemente. Sin embargo, ésta continúa siendo una enfermedad incurable. Las terapias actuales solo se basan en combatir los síntomas motores de la enfermedad, pero son incapaces de parar o de ralentizar su progresión (Gouda et al., 2022; Sharma et al., 2022). Además, estudios epidemiológicos apuntan a que la EP puede convertirse en un problema importante a nivel mundial debido al gran aumento estimado en el número de casos (Fletcher et al., 2021; Gouda et al., 2022; Mahmood et al., 2021). Por todo ello, la búsqueda de nuevos tratamientos más eficaces se ha convertido en un objetivo primordial.

Drosophila es un modelo animal ampliamente utilizado para el estudio de las EN (ver sección 1.8.2). Más en concreto, nuestro grupo trabaja con un modelo de la EP en *Drosophila* basado en la mutación del gen *DJ-1 β* (ortólogo del gen *DJ-1* humano, causante de casos de EPf). Las moscas mutantes *DJ-1 β* presentan fenotipos característicos de la EP, como son la presencia de defectos locomotores, una reducción de la esperanza de vida, el incremento de los niveles de ROS o la hipersensibilidad a condiciones de elevado EO (Casani et al., 2013; Lavara-Culebras et al., 2010; Lavara-Culebras & Paricio, 2007). Además, también se ha demostrado que estas moscas son una herramienta idónea para evaluar la eficacia de compuestos candidatos para tratar la EP (Sanz et al., 2017). De hecho, este modelo permite la evaluación *in vivo* de un gran número de compuestos, estudiando su efecto sobre fenotipos de comportamiento, como pueden ser los defectos motores.

Por lo tanto, uno de los objetivos principales planteados en este trabajo fue la realización de un rastreo químico a gran escala (RGE) para identificar nuevos compuestos potencialmente terapéuticos para el tratamiento de la EP. Para alcanzar este objetivo, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Realización de un RGE en un modelo en *Drosophila* de la EPf, concretamente en moscas mutantes *DJ-1 β* , evaluando el efecto de los compuestos incluidos en la quimioteca Prestwick® sobre la actividad motora de las moscas.
2. Validación de los compuestos identificados en el RGE en un modelo celular de la EP basado en el silenciamiento del gen *DJ-1*, y estudio de su mecanismo de acción.

Por otro lado, se ha demostrado recientemente que las alteraciones metabólicas pueden jugar un papel importante en el desarrollo de la EP (Anandhan et al., 2017; Solana-Manrique et al., 2020, 2022). De hecho, varios estudios epidemiológicos apuntan a que la DMT2 puede ser un factor de riesgo de padecer la EP (Fiory et al., 2019). Curiosamente, un artículo reciente publicado por nuestro grupo muestra que los mutantes *DJ-1 β* presentan elevados niveles de trehalosa (el principal carbohidrato presente en hemolinfa de *Drosophila*), así como alteraciones en otros metabolitos, lo que confirma que estas moscas modelo de la EP sufren una desregulación del metabolismo (Solana-Manrique et al., 2022). Además, un rastreo

piloto realizado por nuestro grupo permitió identificar a la metformina, un fármaco antidiabético, como un posible candidato para tratar la EP. Debido a todo ello, nos hemos planteado el siguiente objetivo adicional:

3. Determinar si hay mecanismos comunes en la DM y la EP usando modelos de ambas enfermedades en *Drosophila*.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

3.1.1. Stocks de *Drosophila melanogaster* y medio de cultivo

Para la realización de esta tesis se han utilizado diversas cepas de *Drosophila*. Como control se ha utilizado la cepa y^1, w^{1118} (abreviada como y,w), que fue obtenida en el Bloomington *Drosophila* Stock Center (<https://bdsc.indiana.edu/>). Como modelo principal de EPf se ha utilizado la cepa $w^{1118}; DJ-1\beta^{ex54}$ (abreviada como $DJ-1\beta$), amablemente proporcionada por el Dr. J. Chung (Park et al., 2005). Esta cepa presenta una delección de aproximadamente 450 pb que elimina los dos primeros exones y el sitio de inicio de la traducción del gen $DJ-1\beta$. Además, también se ha utilizado un segundo modelo en *Drosophila* de EPf, la cepa $park^{25}/TM3$ (abreviada como $park$), amablemente proporcionada por el Dr. A.J. Whitworth (Greene et al., 2003).

Los stocks de *Drosophila* fueron mantenidos en medio de cultivo estándar (la composición detallada se muestra en la Tabla 2) y a 25 °C, a no ser que se indiquen otras condiciones.

Tabla 2. Composición del medio de cultivo estándar de *Drosophila*. La tabla muestra la receta para preparar un litro de dicho medio.

Componente	Concentración	Cantidad
Azúcar	5% (p/v)	50 g
Levadura	6% (p/v)	60 g
Harina de maíz	6% (p/v)	60 g
Harina de soja	1% (p/v)	10 g
Agar	1.05% (p/v)	10.5 g
Nipagin (parahidroxibenzoato de metilo)	0.3% (p/v)	3 g
Etanol	1% (v/v)	10 ml
Ácido propiónico	0.5% (v/v)	5 ml
H ₂ O		985 ml

3.1.1.1. Modelo de la enfermedad de Parkinson esporádica en *Drosophila* inducido con rotenona

La rotenona es un compuesto con actividad pesticida que ha sido ampliamente utilizado para generar modelos de la EPe en diferentes animales. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición del complejo I de la CTE, lo que produce un aumento de los niveles de EO, conduciendo a la pérdida de neuronas DA en la SNpc (Innos & Hickey, 2021).

Para generar el modelo de EPe, grupos de 45 moscas y,w de 1 día de edad fueron transferidas a tubos con medio de cultivo estándar suplementado con una concentración de rotenona de 500 μ M durante 7 días. La rotenona se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) y se preparó una disolución stock de 100 mM. Las moscas se cambiaron a tubos con medio de cultivo fresco cada 2 días.

3.1.1.1. Modelo de la Diabetes Mellitus tipo 2 en *Drosophila*

Hasta la fecha, se han desarrollado diferentes estrategias para generar modelos de la DMT2 en *Drosophila*. Para la realización de esta tesis, hemos utilizado un modelo en el que se induce la DMT2 en moscas cultivadas en medio estándar de *Drosophila* pero que contiene una concentración de azúcar del 30%, la cual es 6 veces superior. Desde este momento nos referiremos a este medio como HSD (de *high sugar diet*), y al medio de cultivo estándar como ND (de *normal diet*) (Morris et al., 2012).

3.1.2. Modelo celular de la enfermedad de Parkinson y medio de cultivo

Para el desarrollo de esta tesis se han utilizado dos líneas celulares derivadas de la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y, generadas previamente en nuestro laboratorio (Sanz et al., 2017). Las líneas mutantes *DJ-1* fueron generadas por transfección estable de células SH-SY5Y con el plásmido pLKO.1-DJ-1, que contiene una secuencia para la formación de una horquilla correspondiente a la región codificante del gen *DJ-1*. Esto provoca el silenciamiento del gen *DJ-1* por el mecanismo de ARN de interferencia (ARNi). Como control, se usaron células SH-SY5Y transfectadas de forma estable con el plásmido pLKO.1-NT (denominadas *pLKO*), que contiene una secuencia para la formación de una horquilla sin homología con ningún gen humano. El vector pLKO.1 contiene un gen de resistencia a la puromicina que se expresa en células de mamífero, y es el que permite seleccionar las células transfectadas.

Las líneas celulares utilizadas en esta tesis fueron mantenidas en el medio selectivo de Eagle Modificado por Dulbecco/Mix de nutrientes F12 (*DMEM-F12*, *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12*) con glutamina estable (Labclinics, S.A.) suplementado con 2 µg/ml de puromicina (Biowest), suero fetal bovino (SFB) inactivado al 10% (v/v) (Capricorn Scientific) y 100 mg/ml de penicilina/estreptomicina (Labclinics, S.A.) a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% (v/v).

3.1.3. Modelo de la Diabetes Mellitus tipo 2 en ratón

El trabajo con ratones se llevó a cabo de acuerdo con el comité ético de experimentación animal (protocolo OEBA-ULPGC 10/2019R1) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Esta parte del proyecto se realizó en colaboración con el grupo de la Dra. Silvia Muñoz Descalzo del Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC). Los individuos utilizados fueron hembras C57BL/6J de 10 meses de edad alimentadas en condiciones normales (Envigo, Global Diet 2014), en las que el contenido en grasas es del 4%. Para generar el modelo de la DMT2, los ratones fueron alimentados con una dieta cuyo contenido en grasas es del 60% (D12492; Research Diets, New Brunswick, NJ) durante 12 semanas (Surwit et al., 1988). A esta dieta se le denominó HFD (de *high-fat diet*), mientras que a la dieta control se le denominó ND (de *normal diet*). Tras ese tiempo, los animales fueron sacrificados mediante sobredosis de anestesia (isofluorano). Posteriormente, se

extrajeron los cerebros de ratones control y modelo de la DMT2, que fueron rápidamente congelados en N₂ líquido y conservados a -80 °C.

3.2. Tratamientos de los modelos de *Drosophila* y del modelo celular con compuestos potencialmente terapéuticos

3.2.1. Rastreo a gran escala en moscas mutantes *DJ-1β*

Los compuestos analizados durante la realización del rastreo a gran escala con las moscas modelo de la EPf (mutantes *DJ-1β*) fueron los incluidos en la quimioteca Prestwick®. Esta quimioteca contiene un total de 1120 compuestos, los cuales están disueltos en DMSO al 100% y se encuentran a una concentración de 5 mM. Con el objetivo de identificar compuestos que fueran capaces de suprimir los defectos motores de las moscas mutantes *DJ-1β*, se evaluó su eficacia a una concentración final de 10 μM. Para ello, 40 larvas en fase L2 fueron introducidas en tubos (100 x 16 mm, SARSTED) que contenían 1 ml de medio de cultivo estándar suplementado con DMSO al 0.2% (control), o con los compuestos candidatos a una concentración final de 10 μM. Tras su eclosión, las hembras fueron recogidas y transferidas a tubos nuevos. A los 5 días de edad, se realizó un ensayo de escalada para evaluar la eficacia de los compuestos para suprimir los defectos motores (ver sección 3.3).

3.2.2. Tratamiento de moscas mutantes *park* con los compuestos candidatos

Para evaluar la eficacia de los compuestos candidatos en las moscas mutantes *park*, 80 larvas en fase L2 fueron transferidas a tubos (75 x 23.5 mm, SARSTED) con comida suplementada con DMSO al 0.1% o con los compuestos candidatos a una concentración de 10 μM. Tras su eclosión, machos adultos homocigotos de la cepa *park* fueron recogidos y transferidos a tubos nuevos, y tras 3-4 días se realizó el ensayo de escalada para evaluar la eficacia de los compuestos candidatos (ver sección 3.3).

3.2.3. Tratamiento de las moscas modelo de la Diabetes Mellitus tipo 2 con metformina

Para evaluar el efecto de la metformina sobre los diferentes fenotipos presentes en las moscas modelo de la DMT2, hembras *y,w* de 1 día de edad fueron cultivadas en HSD suplementado con DMSO al 0.1% (control) o metformina a una concentración de 25 mM (la concentración seleccionada fue la que se utilizó durante el rastreo piloto).

3.2.4. Tratamiento del modelo celular de la enfermedad de Parkinson con los compuestos candidatos

Para evaluar el efecto de los compuestos en el modelo celular, las células se sembraron en placas multipocillo (diferentes dependiendo del experimento a realizar) y en medio de cultivo suplementado con DMSO al 0.1% (grupo control), o con el compuesto a ensayar a la concentración deseada durante 24 h. Las células

fueron mantenidas en todo momento a 37 °C y en una atmósfera de CO₂ del 5% (v/v). Una vez transcurridas 24 h de tratamiento, se realizó el experimento correspondiente.

3.3. Ensayo de escalada en *Drosophila*

Para estudiar si los compuestos eran capaces de mejorar la actividad motora de las moscas, se utilizó un ensayo de escalada. Este ensayo aprovecha una respuesta innata de escape que presenta *Drosophila*, llamada geotaxis negativa (Moulin et al., 2021).

Para la realización del ensayo de escalada en los mutantes *DJ-1β* y en las moscas modelo de la DMT2, se utilizó el método desarrollado en Sanz et al. (2017). Grupos de 15-20 moscas se introdujeron en tubos transparentes graduados de 1.5 cm de grosor y 25 cm de alto, y se mantuvieron en éstos durante 1 min para que se aclimataran. Posteriormente se les hizo caer al fondo del tubo mediante la aplicación de golpes suaves, y se les permitió ascender dentro de los tubos. Todo el proceso fue grabado en vídeo. Se analizaron un total de entre 80-120 moscas por cada grupo experimental. Finalmente, los videos fueron analizados y se determinó la altura que alcanzaba cada mosca a los 10 s. Los resultados obtenidos en las moscas problema son referenciados a los de los controles para cada experimento, a los que se les asigna un valor de 100%.

Para la realización del ensayo de escalada en las moscas mutantes *park* se utilizó un protocolo adaptado del publicado por el grupo que nos proporcionó dicha cepa (Greene et al., 2003). Grupos de 10-15 moscas se introdujeron en tubos (95 x 28.5 mm) y se permitió que se aclimataran durante 1 min. Posteriormente, se les hizo caer al fondo mediante la aplicación de golpes suaves y se les permitió ascender por el tubo. Se analizaron un total de 60-100 moscas por cada grupo experimental. Todo el proceso fue grabado en video y se cuantificó el número de moscas que fueron capaces de sobrepasar una línea situada a 7 cm del fondo del tubo durante 10 s. Los resultados se referenciaron a los obtenidos en las moscas control *y,w*, a los que se le dio un valor de 100%.

3.4. Ensayo de supervivencia en *Drosophila*

Con el objetivo de analizar la esperanza de vida en el modelo de la DMT2 en *Drosophila*, se realizó un ensayo de supervivencia. Para ello, se introdujeron 30 hembras adultas en tubos que contenían ND o HSD, y se cultivaron a 25 °C en todo momento. Las moscas se pasaron a tubos con medio fresco cada 2-3 días, y se contó el número de moscas que quedaban vivas. Se realizaron al menos tres réplicas de cada grupo experimental. El resultado se expresó en porcentaje de moscas vivas en cada contaje.

3.5. Estimación del peso de moscas adultas

Grupos de 10 hembras adultas de cada grupo experimental fueron pesadas en una balanza de precisión para estimar su peso total. Al menos 6 réplicas de cada grupo experimental fueron analizadas.

3.6. Cuantificación de niveles de glucógeno y carbohidratos solubles en extractos de *Drosophila*

La cuantificación tanto de glucógeno como de carbohidratos solubles se realizó usando un protocolo adaptado de Foray et al. (2012), utilizando el reactivo antrona (9,10-dihidro-9-oxoantraceno). Este compuesto interacciona con mono, di y polisacáridos en suspensión, produciéndose un color verde o azul (Foray et al., 2012). Grupos de 5 moscas hembra de cada condición a estudiar se homogeneizaron en 200 μ l de PBS 1X, en presencia de una bolita de acero. La homogeneización se llevó a cabo en un *TissueLyser LT* (Qiagen) durante 2 min a 50 Hz. Los extractos obtenidos fueron centrifugados a 180g durante 10 min a 4 °C, y se recogió el sobrenadante. A continuación, a 90 μ l del extracto obtenido se le añadieron 10 μ l de sulfato de sodio al 20% (p/v) y 750 μ l de etanol al 100% (v/v). Tras una agitación fuerte, las muestras se centrifugaron a 180g durante 15 min a 4 °C. En este paso, el glucógeno se encontraba en el precipitado y los carbohidratos solubles en el sobrenadante.

Para la cuantificación de glucógeno, el pellet se lavó 2 veces con metanol al 80%, y posteriormente se le añadió 1 ml del reactivo antrona [1.42 mg/ml en ácido sulfúrico al 70% (v/v)]. Las muestras fueron incubadas a 90 °C durante 15 min, y después se enfriaron en hielo. Finalmente, 200 μ l de cada muestra se transfirieron a una placa transparente de 96 pocillos, y se midió la absorbancia a 625 nm usando el lector de placas *Infinite 200 PRO* (Tecan).

Para la cuantificación de carbohidratos solubles, el sobrenadante se centrifugó en la centrífuga de vacío y se permitió que las muestras se evaporaran hasta que quedó aproximadamente 20 μ l de cada una de ellas. A continuación, se añadieron 750 μ l del reactivo antrona [1.42 mg/ml en ácido sulfúrico al 70% (v/v)]. Las muestras fueron incubadas a 90 °C durante 15 min, y posteriormente se enfriaron en hielo. Finalmente, 200 μ l de cada muestra se transfirieron a una placa transparente de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 625 nm usando el lector de placas *Infinite 200 PRO* (Tecan).

Tanto en la cuantificación de glucógeno como en la de carbohidratos solubles se realizaron tres réplicas técnicas y tres réplicas biológicas de cada grupo experimental y los resultados se referenciaron al valor del grupo control.

3.7. Ensayo de viabilidad en células SH-SY5Y

La viabilidad celular se midió utilizando el reactivo MTT (bromuro de 3-[4,5-dimethyliazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazol) (Sigma-Aldrich). El MTT es un compuesto que, al entrar en las células vivas, es metabolizado por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial formando unos cristales de color azul (cristales de

formazán). La cantidad de cristales de formazán presentes es un parámetro que se puede utilizar para estimar la viabilidad celular en los experimentos realizados. Las células *DJ-1* no presentan diferencias en su viabilidad con respecto a las células control. Sin embargo, son más sensibles a condiciones de EO (Sanz et al., 2017; Xicoy et al., 2017). Por ello, los ensayos realizados en el modelo celular se llevaron a cabo en condiciones de elevado EO, inducido con H₂O₂.

Para realizar el ensayo de viabilidad celular, se sembraron 1.8×10^4 células por pocillo en una placa transparente de 96 pocillos, bien en medio estándar suplementado con DMSO al 0.1% como control o con la concentración deseada de los compuestos a estudiar, y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Tras este tiempo, las células fueron sometidas a EO mediante la incubación con H₂O₂ a una concentración final de 100 µM durante 3 h a 37 °C. Posteriormente, a cada pocillo se añadieron 10 µl de una solución de 5 mg/ml de MTT y se dejó incubar durante 3 h más. Finalmente, se añadió a cada pocillo 110 µl de una solución de HCl al 0.04 N en 2-propanol, para disolver los cristales de formazán formados, y se midió la absorbancia a 570 nm y 690 nm usando el lector de placas *Infinite 200 PRO* (Tecan). Se realizaron tres réplicas técnicas y tres réplicas biológicas de cada grupo experimental y los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad referenciándose al valor del grupo control.

3.8. Cuantificación de actividades enzimáticas

3.8.1. Extracción de proteínas para la realización de los ensayos enzimáticos

Los extractos de proteínas de *Drosophila* se obtuvieron a partir de grupos de 20 hembras adultas de cada grupo experimental. Éstos se homogeneizaron en 200 µl de Tris-HCl 50 mM pH 7.4, en presencia de inhibidores de proteasas Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific) y de una bolita de acero. La homogeneización se llevó a cabo en un *TissueLyser LT* (Qiagen) durante 5 min a 50 Hz. Los extractos obtenidos fueron centrifugados a 9,000g durante 10 min a 4°C y se recogió el sobrenadante.

Los extractos celulares se obtuvieron mediante el método de congelación/descongelación a partir de alícuotas de 3×10^6 células por grupo experimental. Dichas alícuotas se centrifugaron a 300g durante 5 min y se recogió el precipitado donde estaban las células. Posteriormente, el precipitado se lavó con PBS al 1% (v/v) y se resuspendió en 100 µl de Tris-HCl 200 mM pH 7.8 y KCl 600 mM, al que se añadieron inhibidores de proteasas Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific). Las células resuspendidas fueron congeladas en N₂ líquido, se descongelaron en hielo y fueron sometidas a agitación suave. Este proceso se repitió 3 veces y finalmente los lisados fueron centrifugados a 15.000g durante 10 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante.

La concentración de proteínas tanto de los extractos de *Drosophila* como de células se determinó utilizando el kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher), siguiendo las instrucciones del fabricante. Por último, se igualó la concentración de

todos los extractos para realizar las mediciones de las actividades enzimáticas usando el mismo volumen y cantidad de proteínas.

3.8.2. Actividad enolasa

La cuantificación de la actividad de la enzima enolasa (Eno, EC 4.2.1.11) se realizó mediante el uso de reacciones acopladas (Solana-Manrique et al., 2020). A una placa transparente de 96 pocillos se añadieron 100 μ l de tampón de ensayo [100 mM de KCl, 10 mM de $MgCl_2$, 20 mM de HEPES pH 7, 1.75 mM de ADP, 0.5 mM de NADH, 15 U/mL de piruvato quinasa, 15 U/mL de lactato deshidrogenasa, pH 7.4] y 25 μ g de proteína de cada grupo experimental. Tras 5 min de incubación, la reacción se inició añadiendo una concentración final de fosfoglicerato de 2 mM. Finalmente, se midió la absorbancia a 340 nm a intervalos de 30 s durante 20 min a 37 °C usando el lector de placas *Infinite 200 PRO* (Tecan). La actividad enzimática se calculó a partir de la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la oxidación de NADH a NAD^+ . Se realizaron tres réplicas técnicas y tres réplicas biológicas de cada grupo experimental y los resultados se expresaron como actividad enzimática relativa referenciándose al valor del grupo control.

3.8.3. Actividad fosfofructoquinasa

La cuantificación de la actividad de la enzima fosfofructoquinasa (Pfk, EC 2.7.1.11) se realizó utilizando reacciones acopladas (Solana-Manrique et al., 2020). A una placa transparente de 96 pocillos se añadieron 100 μ l de tampón de ensayo [91.1 mM de Tris-HCl pH 9, 1 mM de ATP, 5 mM de KCl, 2 mM de $MgSO_4$, 0.728 mM de fosfoenolpiruvato, 0.5 mM de NADH, 5 U/mL de piruvato quinasa, 10 U/mL de lactato deshidrogenasa, pH 8] y 40 μ g de proteína de cada grupo experimental. Tras 5 min de incubación, la reacción se inició añadiendo una concentración final de fructosa 6-fosfato de 10 mM. Finalmente, se midió la absorbancia a 340 nm a intervalos de 30 s durante 20 min a 25 °C en el caso de extractos de *Drosophila* y a 37 °C en el caso de extractos celulares usando el lector de placas *Infinite 200 PRO* (Tecan). La actividad enzimática se calculó a partir de la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la oxidación de NADH a NAD^+ . Se realizaron tres réplicas técnicas y tres réplicas biológicas de cada grupo experimental y los resultados se expresaron como actividad enzimática relativa referenciándose al valor del grupo control.

3.8.4. Actividad hexoquinasa

La cuantificación de la actividad de la enzima hexoquinasa (Hex-A en *Drosophila* y Hk en el modelo celular, EC 2.7.1.1) se realizó utilizando reacciones acopladas (Solana-Manrique et al., 2020). A una placa transparente de 96 pocillos se añadieron 100 μ l de tampón de ensayo [20 mM de Tris-HCl pH 9, 2 mM de $MgCl_2$, 2 mM de ATP, 1 mM de $NADP^+$, 5 U/mL de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, 10 U/mL de lactato deshidrogenasa, pH 7.3] y 15 μ g de proteína de cada grupo experimental. Tras 5 min de incubación, la reacción se inició añadiendo una concentración final de glucosa de

100 mM. Finalmente, se midió la absorbancia a 340 nm a intervalos de 30 s durante 20 min a 25 °C en el caso de extractos de *Drosophila* y a 37 °C en el caso de extractos celulares usando el lector de placas *Infinite 200 PRO* (Tecan). La actividad enzimática se calculó a partir del aumento de la absorbancia a 340 nm debido a la reducción de NADP⁺ a NADPH. Se realizaron tres réplicas técnicas y tres réplicas biológicas de cada grupo experimental y los resultados se expresaron como actividad enzimática relativa referenciándose al valor del grupo control.

3.8.5. Actividad piruvato quinasa

La cuantificación de la actividad de la enzima piruvato quinasa (PyK en *Drosophila* y Pk en células humanas, EC 2.7.1.40) se realizó utilizando reacciones acopladas (Solana-Manrique et al., 2020). A una placa transparente de 96 pocillos se añadieron 100 µl de tampón de ensayo [50 mM de HEPES pH 7.4, 60 mM de KCl, 8 mM de MgSO₄, 2 mM de ADP, 0.5 mM NADH, 10 U/mL de lactato deshidrogenasa, pH 7.3] y 15 µg de proteína de cada grupo experimental. Tras 5 min de incubación, la reacción se inició añadiendo una concentración final de fosfoenolpiruvato de 2 mM. Finalmente, se midió la absorbancia a 340 nm a intervalos de 30 s durante 20 min a 25 °C en el caso de extractos de *Drosophila* y a 37 °C en el caso de extractos celulares usando el lector de placas *Infinite 200 PRO* (Tecan). La actividad enzimática se calculó a partir de la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la oxidación de NADH a NAD⁺. Se realizaron tres réplicas técnicas y tres réplicas biológicas de cada grupo experimental y los resultados se expresaron como actividad enzimática relativa referenciándose al valor del grupo control.

3.9. Cuantificación de los niveles de ATP

Los niveles de ATP se cuantificaron usando el kit *ATP Determination Kit* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el caso de *Drosophila*, se utilizó el protocolo descrito en Solana-Manrique et al. (2022). Grupos de 5 hembras adultas de cada grupo experimental se homogeneizaron en 200 µl de tampón de reacción (incluido en el kit comercial) y con una bolita de acero, en un *TissueLyser LT* (Qiagen) durante 2 min a 50 Hz. A continuación, los extractos se hirvieron durante 4 min para inactivar las enzimas presentes que pudieran utilizar el ATP de las muestras, y después se centrifugaron a 18,500g durante 10 min a 4 °C, recogiendo el sobrenadante. Posteriormente, a una placa blanca de 96 pocillos se añadieron 100 µl de solución de reacción estándar (incluida en el kit comercial) y 5 µl de los extractos de *Drosophila*. La luminiscencia se midió usando el lector de placas *Infinite 200 PRO* (TECAN). Se realizaron tres réplicas técnicas y tres réplicas biológicas de cada grupo experimental, y los resultados se expresaron como intensidad de luminiscencia por mg de proteína, referenciándose al valor del grupo control.

En el caso del modelo celular, se sembraron 10 x 10⁴ células por pocillo de cada condición a estudiar en una placa blanca de 96 pocillos en medio de cultivo estándar, bien suplementado con DMSO al 0.1% (control) o con la concentración

deseada del compuesto a estudiar, durante 24 h. Posteriormente, las células fueron sometidas a EO mediante la incubación con H₂O₂ a una concentración final de 50 µM durante 3 horas. A continuación, se añadió 100 µl de solución de reacción estándar (incluida en el kit comercial) y la luminiscencia se midió usando el lector de placas *Infinite 200 PRO* (TECAN). Paralelamente, se realizó un ensayo de viabilidad usando el método de MTT en las mismas condiciones para referenciar el valor de luminiscencia a la viabilidad celular. Se realizaron tres réplicas técnicas y tres réplicas biológicas de cada grupo experimental, y los resultados se expresaron como intensidad de luminiscencia por viabilidad celular, referenciándose al valor del grupo control.

3.10. Cuantificación de los niveles de estrés oxidativo

3.10.1. Cuantificación de niveles de H₂O₂ en extractos de *Drosophila*

Los niveles de H₂O₂ en *Drosophila* se cuantificaron utilizando el kit *Amplex H₂O₂ Red Kit* (Invitrogen). Para ello, se siguió el protocolo utilizado en Sanz et al. (2017). Grupos de 10 hembras adultas de cada condición a estudiar se homogeneizaron en 200 µl de Tris-HCl 50 mM pH 7.4, en presencia de inhibidores de proteasas Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific) y de una bolita de acero. La homogeneización se llevó a cabo en un *TissueLyser LT* (Qiagen) durante 5 min a 50 Hz. Los extractos obtenidos fueron centrifugados a 9,000g durante 10 min a 4 °C, y se recogió el sobrenadante. Posteriormente, los niveles de H₂O₂ se midieron en una placa negra de 96 pocillos siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se cuantificaron los niveles de fluorescencia a longitudes de onda de excitación y de emisión de 571 nm y 585 nm, respectivamente, usando el lector de placas *Infinite 200 PRO* (Tecan). Se realizaron tres réplicas técnicas y tres réplicas biológicas de cada grupo experimental, y los resultados se expresaron como intensidad de fluorescencia por mg de proteína referenciándose al valor del grupo control.

3.10.2. Cuantificación de niveles de carbonilación de proteínas en extractos de *Drosophila*

Esta cuantificación se realizó mediante el ensayo de derivatización con 4-dinitrofenilhidracina (DNPH) descrito en Mesquita et al. (2014). Grupos de 10 hembras adultas de cada condición a estudiar se homogeneizaron en 200 µl de Tris-HCl 50 mM pH 7.4, en presencia de inhibidores de proteasas Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific) y de una bolita de acero. La homogeneización se llevó a cabo en un *TissueLyser LT* (Qiagen) durante 5 min a 50 Hz. Los extractos obtenidos fueron centrifugados a 9,000g durante 10 min a 4 °C, y se recogió el sobrenadante. Posteriormente, en una placa transparente de 96 pocillos, se añadieron 50 µl del extracto y 50 µl de una disolución 10 mM de DNPH. Tras 10 min de incubación, se añadió 25 µl de una disolución de 6 M de NaOH para detener la reacción, y después se midió la absorbancia a 450 nm usando el lector de placas *Infinite 200 PRO* (Tecan). Se realizaron tres réplicas técnicas y tres réplicas biológicas de cada grupo

experimental, y los resultados se expresaron como intensidad de absorbancia por mg de proteína referenciados al valor del grupo control.

3.10.3. Cuantificación de los niveles de O_2^- en células SH-SY5Y

Los niveles de O_2^- en células SH-SY5Y se cuantificaron utilizando la sonda fluorescente dihydroethidium (Invitrogen). Para ello, se siguió un protocolo adaptado de Kim et al. (2012). En una placa negra de 96 pocillos se sembraron 1.8×10^4 células por pocillo en medio estándar suplementado con DMSO al 0.1% como control o con vincamina a una concentración de $10 \mu\text{M}$, y se incubaron durante 24 h a 37°C . Tras este tiempo, las células fueron sometidas a EO mediante la adición de H_2O_2 a una concentración final de $100 \mu\text{M}$ durante 3 h y se mantuvieron a 37°C . Posteriormente, se añadió a cada pocillo una concentración final de $10 \mu\text{M}$ de dihydroethidium. Los niveles de fluorescencia se midieron a tiempo 0 min y 30 min, a unas longitudes de onda de excitación y de emisión de 571 nm de 585 nm, respectivamente, usando el lector de placas *Infinite 200 PRO* (Tecan). La cuantificación de los niveles de O_2^- se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$[(F_{30\text{min}} - F_{0\text{min}}) / F_{0\text{min}}] \times 100.$$

Siendo $F_{30\text{min}}$ el valor de fluorescencia obtenido a los 30 min y $F_{0\text{min}}$ el valor de fluorescencia a los 0 min.

Se realizaron tres réplicas técnicas y tres réplicas biológicas de cada grupo experimental y los resultados se expresaron como intensidad de fluorescencia relativa referenciándose al valor del grupo control.

3.11. Western blot

3.11.1. Extracción de proteínas

En el caso de *Drosophila*, la extracción de proteínas se realizó siguiendo un protocolo adaptado de Solana-Manrique et al, (2020). Grupos de 50 cabezas de hembras adultas de cada condición a estudiar se homogeneizaron en $200 \mu\text{l}$ de Tris-HCl 50 mM pH 7.4, en presencia de inhibidores de proteasas Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific) y de una bolita de acero. La homogeneización se llevó a cabo en un *TissueLyser LT* (Qiagen) durante 5 min a 50 Hz . Los extractos obtenidos fueron centrifugados a $14,500g$ durante 10 min a 4°C y se recogió el sobrenadante.

En el caso del modelo celular, la extracción de proteínas se realizó siguiendo el protocolo de Solana-Manrique et al. (2020). Alícuotas de 3×10^6 células de cada grupo experimental fueron resuspendidas en tampón Laemmli 2x [65.8 mM de Tris-HCl pH 6.8, glicerol al 26.3% (p/v), SDS al 2.1% (p/v), azul de bromofenol al 0.01% (p/v), 355 mM de 2-mercaptoetanol], al que se añadieron inhibidores de proteasas Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific). Las células fueron lisadas haciéndolas pasar por jeringuillas de diámetro cada vez más reducido. Finalmente,

los lisados fueron centrifugados a 15,000g durante 10 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante.

En el caso del modelo de ratón, los cerebros fueron descongelados y se diseccionaron para obtener la región caudado-putamen. Posteriormente, se homogeneizaron 100 mg de muestra en 1 ml de tampón RIPA al que se añadieron inhibidores de proteasas (PPC1010, Sigma-Aldrich), utilizando el *Ultra-Turrax T25* (IKA). A continuación, los lisados fueron sonicados en hielo durante 20 min en pulsos de 30 s en el *Bioruptor® Standard* (Diagenode). Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 10.000g durante 20 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante.

3.11.2. Electroinmunotransferencia de proteínas

La separación de proteínas de las diferentes muestras se realizó mediante electroforesis SDS-PAGE en un sistema de electroforesis vertical (Bio-Rad) en tampón de electroforesis [25 mM de Tris pH 8.3, 192 mM de glicina y SDS al 1% (p/v)]. Los geles de poliacrilamida utilizados en la electroforesis constaban de 2 fases, una superior con una concentración de poliacrilamida del 5%, y una inferior con una concentración del 10%. Las muestras fueron previamente desnaturalizadas calentándolas a 100 °C durante 5 min. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 70 V mientras las muestras permanecían en la fase superior del gel de poliacrilamida, y de 100 V al pasar a la fase inferior. El siguiente paso fue transferir las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa mediante un sistema de transferencia en tanque. La transferencia se realizó en tampón de transferencia [48mM de Tris pH 9.2, 39 mM de glicina, SDS al 0.037% (p/v) y metanol al 20% (v/v)] a 100 V durante 1 h a 4 °C. Una vez finalizada la transferencia, las membranas fueron lavadas en tampón PBST [137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄, 1.8 mM de KH₂PO₄, Tween-2 al 0.1% (v/v)] en el caso de la detección de las proteínas sin fosforilar, y en tampón TBST [50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl y Tween-20 al 0.1% (v/v)] para la detección de las proteínas fosforiladas. Posteriormente, se incubaron en solución de bloqueo [leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en PBST para las proteínas sin fosforilar, y en TBST para las proteínas fosforiladas] durante 1 h en agitación. A continuación, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios de interés (ver Tabla 3) durante toda la noche a 4 °C en agitación. Tras 3 lavados de 5 min con PBST, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 h a temperatura ambiente. Una vez finalizada esta última incubación, la membrana se lavó 3 veces en PBST y se procedió a revelar la señal usando el reactivo *SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando el *ImageQuant™ LAS 4000* (GE Healthcare). El análisis de las imágenes para calcular los niveles de expresión de proteínas se realizó mediante el software ImageJ (NIH).

Tabla 3. Listado de anticuerpos utilizados en los ensayos de Western blot

Anticuerpo	Casa comercial	Tipo de anticuerpo	Especie	Concentración
anti-Akt	Cell-signaling	Primario	Conejo	1:1000
anti-phospho-Akt (Ser473)	Cell-signaling	Primario	Conejo	1:1000
anti-JNK	Cell-signaling	Primario	Conejo	1:1000
anti-phospho-JNK (Thr183/Tyr185)	Cell-signaling	Primario	Conejo	1:1000
anti-TH	Sigma-Aldrich	Primario	Conejo	1:1000
anti-tubulina α	Hybridoma Bank	Primario	Ratón	1:5000
anti-actina β	Santa Cruz	Primario	Ratón	1:1000
anti-ratón POD	Sigma-Aldrich	Secundario	Cabra	1:5000
anti-conejo POD	Sigma Aldrich	Secundario	Cabra	1:5000

Para cuantificar proteínas fosforiladas se necesita referenciar los resultados obtenidos a los valores de la proteína no fosforilada de la misma muestra. Por tanto, una vez finalizado todo el proceso se procedió a realizar un *stripping* para eliminar los anticuerpos de la membrana. El proceso consistió en incubar la membrana durante 5 min en H₂O, seguido de una incubación de 20 min en NaOH a una concentración de 0.2 M y de una última incubación de 5 min en H₂O. Todo el proceso se realizó en agitación suave y a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se volvió a utilizar para la cuantificación de la proteína de interés desde la fase de bloqueo.

3.12. Análisis de la viabilidad mitocondrial en células SH-SY5Y

La viabilidad mitocondrial se cuantificó mediante el uso de la sonda fluorescente *MitoTracker™ Red FM* (Invitrogen) en el modelo celular. En placas de cultivo P60, se añadieron cubreobjetos de cristal y se sembraron 50×10^4 células en medio de cultivo estándar durante 24 h. Tras esta primera incubación, se retiró el medio y se sustituyó por medio de cultivo estándar suplementado con DMSO al 0.1% (control) o con la concentración deseada de los compuestos a estudiar durante 24 h. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y las células se incubaron con la sonda *MitoTracker™ Red FM* a una concentración de 60 nM diluida en medio de cultivo incompleto (sin FBS) durante 30 min. Finalmente, las células se lavaron 3 veces con PBS y los cubreobjetos se colocaron sobre un portaobjetos de cristal con medio de montaje *Vectashield* (Vector Laboratories). El *Vectashield* es un medio de montaje que incluye la sonda fluorescente DAPI que se utiliza para teñir los núcleos celulares. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio de fluorescencia *Leica DMI3000 B* (Leica) y analizadas con el software ImageJ (NIH).

3.13. Cuantificación de la expresión de genes mediante PCR cuantitativa en tiempo real

3.13.1. Diseño de cebadores

El diseño de cebadores se realizó usando las secuencias de los genes de interés a partir de las bases de datos FlyBase (<http://flybase.org/>) para los genes de *Drosophila* y NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para los genes humanos. Los cebadores se diseñaron usando la herramienta Primer-BLAST del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). En la Tabla 4 se encuentran detallados los cebadores utilizados en el desarrollo de esta tesis.

Tabla 4. Listado de cebadores utilizados en la realización de los ensayos de RT-qPCR.

Gen	Cebador	Secuencia
<i>PI3K</i>	Directo	5'-ATTTGGACTACCTACGGGAA-3'
	Reverso	5'-TGCTTTTTCCTCCGTGTAG-3'
<i>chico</i>	Directo	5'-TATGCACAACACGATACTGAG-3'
	Reverso	5'-GACTCTGTTTTGGCTGACA-3'
<i>InR</i>	Directo	5'-TTTCACGGAAGTCGAACATA-3'
	Reverso	5'-GACCTTAGCATAGCTCGG-3'
<i>Ilp2</i>	Directo	5'-CTGGGAGCTATCTTGGGGGT-3'
	Reverso	5'-ACTCCCGCAGAGCCTTCATA-3'
<i>Ilp3</i>	Directo	5'-TTATGATCGGCGGTGTCCAG-3'
	Reverso	5'-TTGGTCATTGCGTTGAAGCC-3'
<i>Ilp5</i>	Directo	5'-GCGGATTTGGATAGCTCCGA-3'
	Reverso	5'-AAAGGAACACGATTTGCGGC-3'
<i>tubulin</i>	Directo	5'-GATTACCGCCTCTCTGCGAT-3'
	Reverso	5'-ACCAGAGGAAGTGAATACGTG-3'

3.13.2. Extracción de ARN

En el caso de *Drosophila*, la extracción de ARN se realizó a partir de grupos de 10 moscas de cada grupo experimental. En el caso del modelo celular, la extracción de ARN se realizó a partir de alícuotas de 3 x 10⁶ células de cada grupo experimental. La extracción de ARN se realizó usando el reactivo *TRIzol* (Panreac, AppliChem) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron homogeneizadas en 1 ml de reactivo *TRIzol* usando el *TissueLyser LT* (Qiagen) a 50 Hz durante 5 min. La cantidad total de ARN se cuantificó usando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y finalmente se realizó un tratamiento para eliminar ADNasas con el kit *DNase I, RNase-free* (Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.13.3. Obtención del ADNc

La transcripción inversa del ARN obtenido en las diferentes muestras se llevó a cabo usando el kit *FIREScript RT cDNA Synthesis MIX with Oligo(dT) primer* (Solis BioDyne) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se utilizó 1 µg de ARN de cada muestra disuelto en un volumen final de 20 µl. A continuación, con el objetivo de comprobar la obtención de ADNc, se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional utilizando el cebador del gen *housekeeping tubulina* del organismo correspondiente. Esta reacción se llevó a cabo con 1 µl del ADNc obtenido en la reacción anterior y diluido 100 veces, al que se añadió el siguiente mix:

10x Standard Reaction Buffer with MgCl ₂ (Biotools)	2 µl
Mix de dNTPs (10 mM) (Roche)	0.4 µl
Cebador directo	1 µl
Cebador reverso	1 µl
ADN polimerasa (Biotools)	0.4 µl
Agua libre de nucleasas	14.2 µl

Posteriormente, para comprobar que los fragmentos de ADN se habían amplificado, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) en tampón de electroforesis TBE 1x [Tris-HCl 10.8 g, 5.5 g de ácido bórico, 4 ml de 0.5 M de EDTA pH 8 y agua hasta 1 l], al que se le añadió bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml. La electroforesis se realizó en cubetas horizontales a un voltaje constante de 110 V. Los fragmentos se visualizaron con luz ultravioleta de 312 nm de longitud de onda. Para poder estimar el tamaño de los diferentes fragmentos de ADN en los geles se empleó el marcador de peso molecular *DNA Molecular Weight Marker VI* (Roche).

3.13.4. RT-qPCR

A partir del ADNc, se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) usando la sonda EvaGreen (Solis BioDyne), siguiendo las instrucciones del fabricante, en un sistema *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Los niveles de expresión del gen *tubulina* se usaron como control interno para determinar la cantidad de ADNc en cada muestra. El análisis de datos se realizó empleando el método del CT comparativo (método $\Delta\Delta CT$) (Schmittgen & Livak, 2001) con el software *StepOnePlus™ v2.3*. Se realizaron cuatro réplicas biológicas y tres réplicas técnicas por cada grupo experimental, y los resultados se expresaron como expresión relativa de los genes referenciándose al valor del grupo control.

3.14. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante una prueba t de Student para todos aquellos estudios en los que se analizaron dos tipos de muestra. Para las comparaciones entre varias muestras se realizó un test ANOVA aplicando el test

Tukey para comparaciones múltiples *post hoc*. Los valores mostrados representan la media de los diferentes grupos experimentales y las barras de error indican la desviación estándar (s.d.). Para el análisis estadístico del ensayo de supervivencia se empleó un test Kaplan-Meier. Las diferencias entre grupos experimentales se consideraron significativas cuando el p-valor<0.05. La representación de los datos se realizó con el software GraphPad Prims 5.0 (GraphPad Software, Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTADOS

4.1. Identificación de compuestos potencialmente terapéuticos para la enfermedad de Parkinson mediante la realización de un rastreo a gran escala

Los RGE permiten evaluar la eficacia de un gran número de compuestos con el objetivo de identificar posibles candidatos para tratar una enfermedad. La gran mayoría de los RGE se llevan a cabo usando modelos celulares. Éstos presentan la ventaja de que son más fáciles y rápidos de realizar (Koszła et al., 2021). Sin embargo, estos modelos tienen una limitación importante y es que carecen de las relaciones entre los diferentes tipos celulares y sistemas que presenta un organismo completo (Aldewachi et al., 2021; Krentz et al., 2019). Con el objetivo de identificar nuevos compuestos candidatos para tratar la EP, en este trabajo hemos realizado un RGE usando un modelo de esta enfermedad en *Drosophila* (basado en la mutación del gen *DJ-1β*), un organismo completo. Para ello, hemos usado la quimioteca Prestwick® que contiene 1120 compuestos a una concentración final de 5 mM y disueltos en DMSO. La figura 10 muestra un esquema de la estrategia seguida para la realización del RGE.

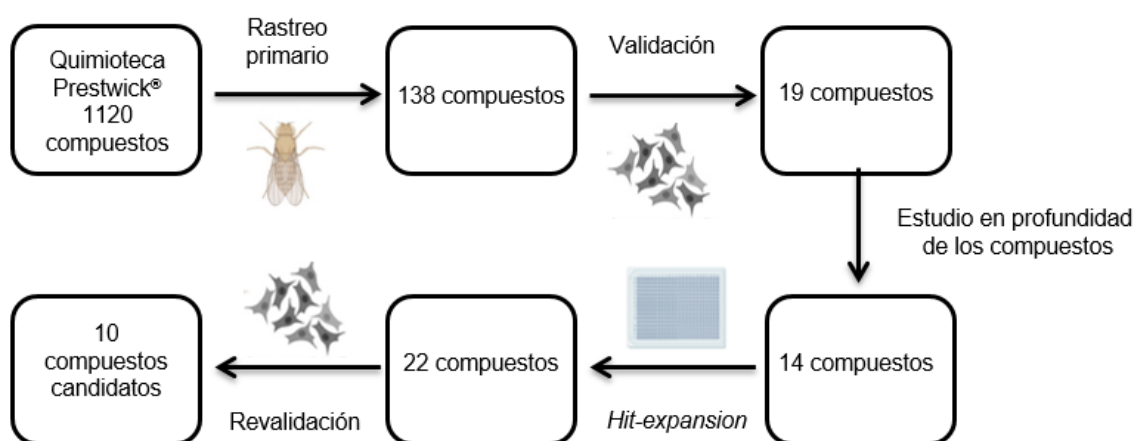


Figura 10. Resumen del rastreo a gran escala. La imagen muestra un resumen de los diferentes pasos llevados a cabo durante la realización del RGE, señalados por una flecha. Además, se muestra el número de compuestos positivos tras la realización de cada uno de los pasos.

El primer paso del RGE fue estudiar si los compuestos de la quimioteca Prestwick® eran capaces de suprimir los defectos motores presentes en las moscas mutantes *DJ-1β*. Para ello, larvas en estadio L2 se cultivaron en medio estándar de *Drosophila* suplementado con una concentración final de 10 μM de cada uno de los compuestos desde ese momento hasta 5 días después de la eclosión de la mosca adulta. Posteriormente, se realizó un ensayo de escalada para analizar el efecto de los compuestos sobre la actividad motora de las moscas. De los 1120 compuestos evaluados, encontramos que 138 fueron capaces de mejorar la actividad motora de los mutantes *DJ-1β* (paso del rastreo primario, Fig. 10, 11). El siguiente paso del RGE consistió en estudiar si estos 138 compuestos eran además capaces de reducir la muerte celular en células SH-SY5Y deficientes en *DJ-1* tras ser sometidas a EO. En este paso, encontramos que 19 de los 138 compuestos presentaban actividad

neuroprotectora (paso de validación, Fig. 10). Tras el paso de validación, se realizó un estudio en profundidad de los compuestos identificados hasta ese momento, y se descartaron 5 de ellos porque provocaban efectos adversos en humanos, como parkinsonismo o alteraciones locomotoras (paso de estudio en profundidad de los compuestos, Fig. 10). Además, se reevaluaron otros 8 compuestos de la quimioteca con mecanismos de acción muy similares a los 14 restantes, pero que no habían mejorado la actividad motora de las moscas mutantes *DJ-1 β* en el rastreo primario (paso de *hit-expansion*, Fig. 10). Nuestra hipótesis fue que estos compuestos podrían ser efectivos, y que el resultado obtenido en el rastreo primario podría haber sido un falso negativo. Por último, los 22 compuestos se revalidaron en el modelo celular, encontrando que 10 de ellos presentaban un efecto beneficioso claro sobre la viabilidad de las células deficientes en el gen *DJ-1* (paso de revalidación, Fig. 10, 12).

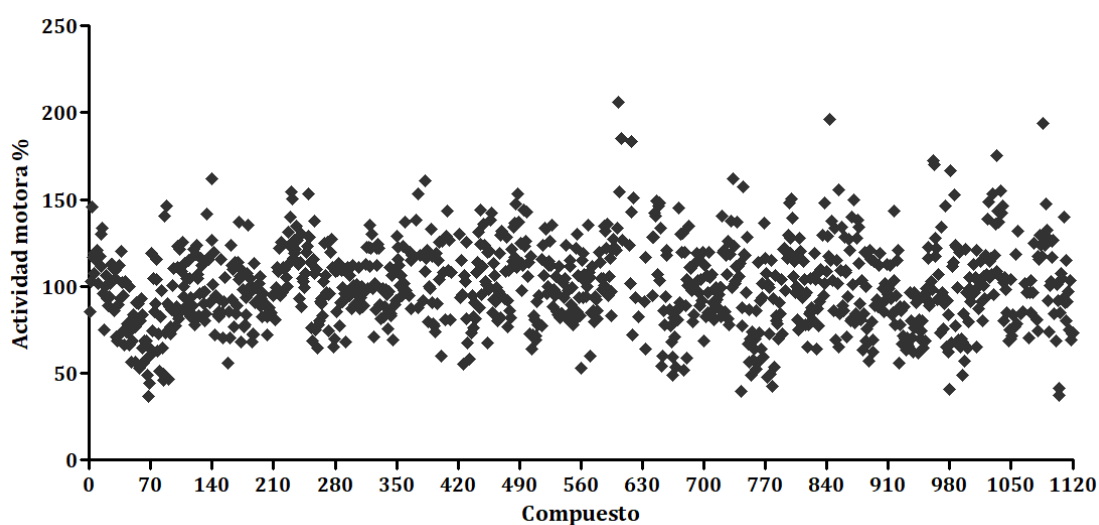


Figura 11. Efecto de los compuestos de la quimioteca Prestwick® en las moscas mutantes *DJ-1 β* . Resultados obtenidos en el primer paso del RGE, en el que se muestra el efecto de los diferentes compuestos sobre la actividad motora de las moscas modelo. Los resultados están referenciados al valor obtenido en moscas mutantes *DJ-1 β* cultivadas en medio control (DMSO al 0.2%), a las que se asignó una actividad motora del 100%.

Entre los compuestos identificados tras la realización del RGE, dos de ellos (la clonidina y la bumetanida) se encuentran actualmente en ensayos clínicos en Fase II llevados a cabo en pacientes con EP (NCT03552068 y NCT03899324, respectivamente) (Fig. 5). Este dato respalda la relevancia de los resultados obtenidos en el RGE. Además, entre los compuestos candidatos, también se encuentra la meclizina, un compuesto antiemético aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA), la agencia reguladora de los medicamentos en los Estados Unidos. Apoyando nuestros resultados del RGE, nuestro grupo ha publicado recientemente un estudio en el que se demuestra que la meclizina es un compuesto candidato para tratar la EP, ya que es capaz de suprimir fenotipos relacionados con esta enfermedad, tanto en las moscas modelo como en las células deficientes en el gen *DJ-1*, provocando un incremento de la glucólisis (Solana-Manrique et al., 2020).

El resto de compuestos identificados en el RGE fueron el zaprinast, la rolitetraciclina, el ácido retinoico, la fentolamina, la sulfasalacina, la vincamina y la flumetasona (Fig. 12).

En los siguientes apartados se procederá a describir los ensayos realizados con algunos de los compuestos identificados en el RGE, haciendo hincapié en el zaprinast y la vincamina.

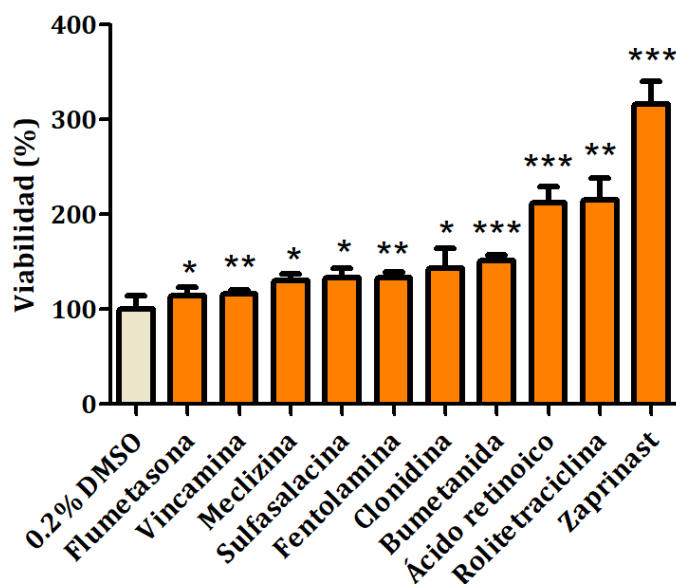


Figura 12. Efecto de los compuestos candidatos sobre la viabilidad de las células mutantes DJ-1. La viabilidad se midió mediante un ensayo de MTT en las células DJ-1 tras ser sometidas a EO mediante la adición de H₂O₂ a una concentración final de 100 μM. Los resultados están referenciados al valor obtenido en las células tratadas en medio vehículo (DMSO al 0.2%). Las barras de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas (*, p-valor<0.05; **, p-valor<0.01; ***, p-valor<0.001).

4.1.1. Estudio del efecto del zaprinast en modelos de la enfermedad de Parkinson

De todos los compuestos identificados tras el paso de revalidación, el zaprinast (ZAP) fue el que consiguió reducir la muerte celular en mayor medida (Fig. 12). Por lo tanto, decidimos estudiar este compuesto en primer lugar. Se ha descrito que el ZAP puede actuar como un inhibidor de fosfodiesterasas (PDE) y como un agonista del receptor GPR35 (*G Protein-Coupled Receptor 35*) (Medina, 2011; Taniguchi et al., 2006). Hasta la fecha, hay pocos estudios que relacionen el ZAP o el receptor GPR35 con la EP. Entre ellos, se ha encontrado que ZAP es capaz de restaurar la depresión estriatal a largo plazo en ratones transgénicos *A53T-SNCA* (Tozzi et al., 2012), y de atenuar la LID en modelos de rata y ratón inducidos químicamente (Picconi et al., 2011; Solís et al., 2015), en ambos casos a través de su actividad inhibitoria de PDE. En este contexto, decidimos analizar el efecto del ZAP sobre nuestros modelos en *Drosophila* y en células humanas para identificar su posible mecanismo de acción.

4.1.1.1. El zaprinast suprime fenotipos relacionados con la enfermedad de Parkinson en diferentes modelos de *Drosophila*

Entre todas las funciones descritas para la proteína DJ-1 (Fig. 7), su actividad antioxidante parece ser una de las más importantes (Raniga et al., 2017). De hecho, diversos modelos de la EP basados en la mutación del gen *DJ-1* presentan niveles elevados de ROS (Casani et al., 2013; Lavara-Culebras & Paricio, 2007; Yang et al., 2017), lo cual parece jugar un papel relevante en la patología de la EP (Poewe et al., 2017; Sanz et al., 2017). Estudios previos realizados por nuestro grupo demostraron que las moscas mutantes *DJ-1 β* presentaban niveles altos de ROS y de carbonilación de proteínas (una modificación post-traduccional que se produce como consecuencia del EO (Solana-Manrique et al., 2020). Además, también se demostró que algunos compuestos con actividad antioxidante, como el ácido ascórbico o el α -tocoferol, eran capaces de reducir los niveles de ROS y de carbonilación de proteínas en las moscas modelo (Casani et al., 2013). En primer lugar, decidimos evaluar el efecto del ZAP sobre estos fenotipos. Los resultados mostraron que los mutantes *DJ-1 β* tratados con ZAP desde estadios larvarios hasta 5 días tras la eclosión de los adultos mostraban una reducción de los niveles de H₂O₂ (uno de los componentes del *pool* de ROS) (Fig. 13A) y de los niveles de carbonilación de proteínas (Fig. 13B). Por lo tanto, estos resultados confirman que el ZAP puede estar ejerciendo un efecto beneficioso en las moscas *DJ-1 β* mediante una reducción de los niveles de ROS. Además, también encontramos que el ZAP era capaz de mejorar la actividad motora en moscas mutantes *park*, otro modelo en *Drosophila* de la EPf (Fig. 13C). Este resultado sugiere que el efecto beneficioso del ZAP no es específico para los mutantes *DJ-1 β* , y que es efectivo en otros modelos de la EP. Respecto a su mecanismo de acción, cabe destacar que *Drosophila* no presenta ningún ortólogo del gen *GPR35*. Por consiguiente, el ZAP debe estar ejerciendo un efecto beneficioso en las moscas modelo de la EP a través de su función como inhibidor de PDE. De hecho, se ha demostrado que el ZAP actúa sobre la PDE1, la PDE6 y la PDE11 de *Drosophila* (Day et al., 2005).

4.1.1.2. El zaprinast ejerce un papel antiapoptótico mediante la activación de la ruta de Akt y la inhibición de vía de la JNK en células mutantes *DJ-1*

A continuación, decidimos estudiar cómo el ZAP podría estar ejerciendo el efecto neuroprotector en las células mutantes *DJ-1*. En primer lugar, realizamos un ensayo de dosis para identificar cuál era la concentración más eficaz del compuesto. En este ensayo, usamos diferentes concentraciones de ZAP (en un rango entre 0.1-80 μ M) y evaluamos su efecto sobre la viabilidad de las células *DJ-1* tras ser sometidas a EO. Los resultados mostraron que el ZAP ejercía un efecto beneficioso en el rango de 0.1-10 μ M, siendo 1 μ M la concentración más efectiva (Fig. 14A). Debido a ello, todos

los experimentos realizados a partir de ese momento en el modelo celular se llevaron a cabo usando esta concentración. También se evaluó su efecto sobre las células control (Fig. 14B). Cabe mencionar que el ZAP no afectó la viabilidad estas células a ninguna concentración, salvo un ligero efecto tóxico a 80 μ M, que se produjo en ambas líneas celulares (Fig. 14A, B).

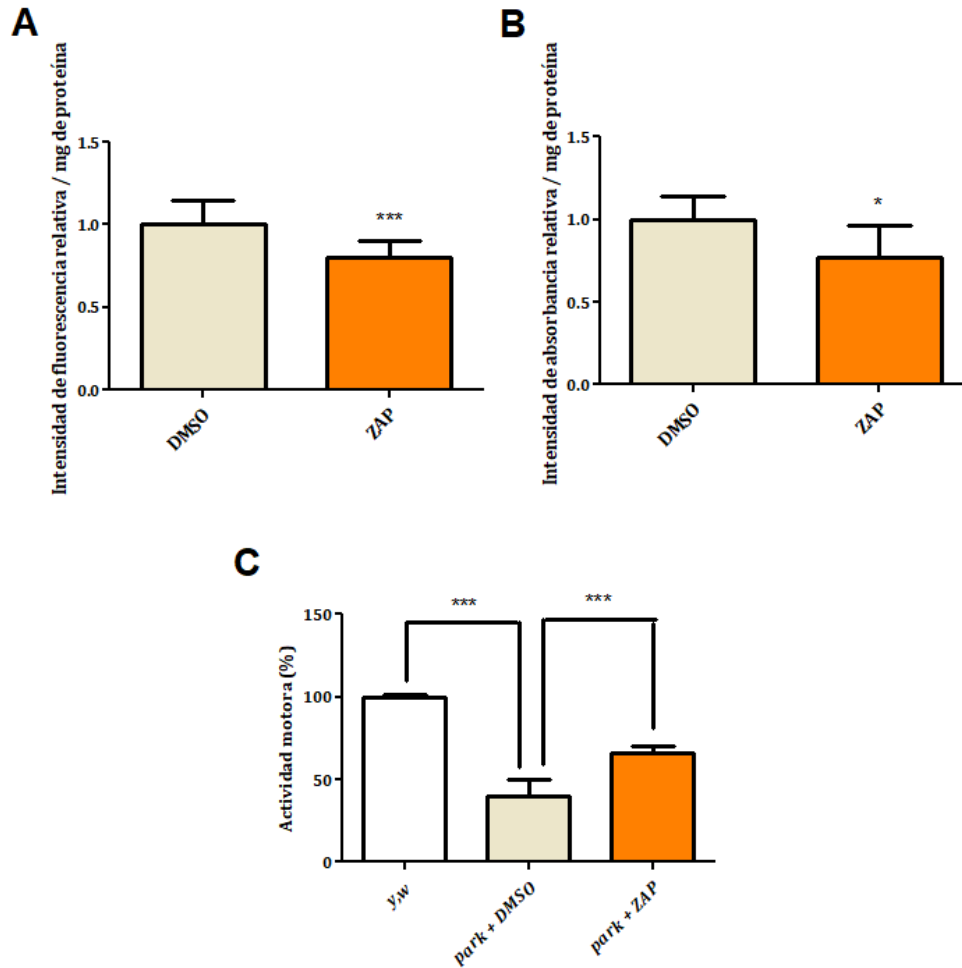


Figura 13. Efecto del ZAP en modelos de la EP en *Drosophila*. (A) Los niveles de H_2O_2 en moscas mutantes *DJ-1 β* se midieron utilizando el kit *Amplex H₂O₂ Red Kit* (Invitrogen). Los resultados se muestran como intensidad de fluorescencia/mg de proteína, referenciándose al valor obtenido en las moscas cultivadas en medio control (DMSO al 0.1%). (B) Los niveles de carbonilación de proteínas se midieron en moscas mutantes *DJ-1 β* usando el compuesto DNPH. Los resultados se muestran como intensidad de absorbancia relativa/mg de proteína, referenciándose al valor obtenido en las moscas cultivadas en medio control (DMSO al 0.1%). (C) La actividad motora de moscas mutantes *park* se evaluó mediante la realización de un ensayo de escalada. Los resultados se referenciaron al valor obtenido en las moscas control (*y,w*) cultivadas en medio control (DMSO al 0.1%). Las barras de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas. (*, p-valor<0.05; ***, p-valor<0.001).

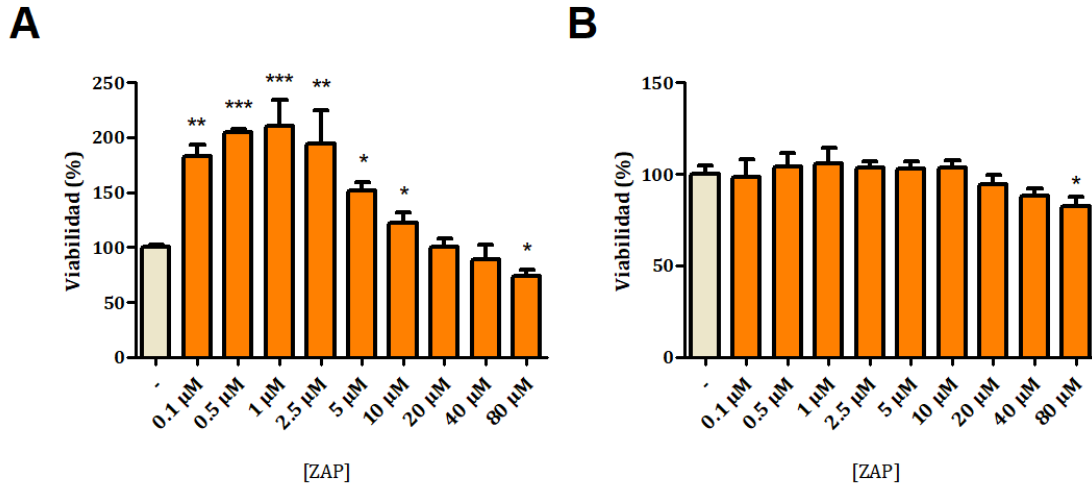


Figura 14. Efecto del ZAP sobre la viabilidad de las células mutantes *DJ-1*. La viabilidad se midió mediante un ensayo de MTT en las células (A) *DJ-1* y (B) *pLKO.1* tras ser sometidas a EO mediante la adición de H₂O₂ a una concentración final de 100 μM. Los resultados están referenciados al valor obtenido en las células cultivadas en medio vehículo (DMSO al 0.1% (-)). Las barras de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas. (*, p-valor<0.05; **, p-valor<0.01; ***, p-valor<0.001).

Entre los procesos implicados en la pérdida de neuronas en la EP, la apoptosis parece jugar un papel importante (Erekat, 2018). La apoptosis es un proceso celular altamente regulado por la acción de diversas quinasas, como la proteína Akt (que promueve la supervivencia) y la proteína JNK (que promueve la apoptosis) (Ambacher et al., 2012). De hecho, en un estudio realizado en células humanas SH-SY5Y y en células de ratón PC12, ambas deficientes para el gen *DJ-1*, se encontró una reducción de la fosforilación de Akt, lo cual conduce a su inactivación. Además, también se detectó un aumento de la fosforilación de JNK, que provoca una sobreactivación de la ruta JNK, lo que conduce a la muerte celular (Dhanasekaran & Premkumar Reddy, 2017; Zhang et al., 2019). Acorde con estos resultados, encontramos que las células mutantes *DJ-1* presentaban una disminución de la fosforilación de Akt y un aumento de la fosforilación de JNK (Fig. 15A, B). Con el objetivo de determinar si el ZAP podría estar ejerciendo su efecto beneficioso a través de la inhibición de la apoptosis, decidimos realizar un western blot para ver su efecto sobre la fosforilación de Akt y de JNK. Los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento de las células mutantes *DJ-1* con ZAP provocaba un aumento de la fosforilación de Akt (Fig. 15C) y una reducción de la fosforilación de JNK (Fig. 15D).

Estos resultados confirman que el ZAP podría estar ejerciendo su efecto neuroprotector a través de una reducción de la apoptosis. De hecho, algunos estudios realizados por otros grupos han demostrado que varios compuestos con actividad inhibitoria de las PDE presentan un efecto antiapoptótico al activar la ruta de Akt (Joshi et al., 2014; Peixoto et al., 2015). Además, se ha demostrado que el ácido pamoico, un potente agonista del receptor GPR35, presenta efecto

neuroprotector mediante el incremento de la fosforilación de Akt (Sharmin et al., 2020).

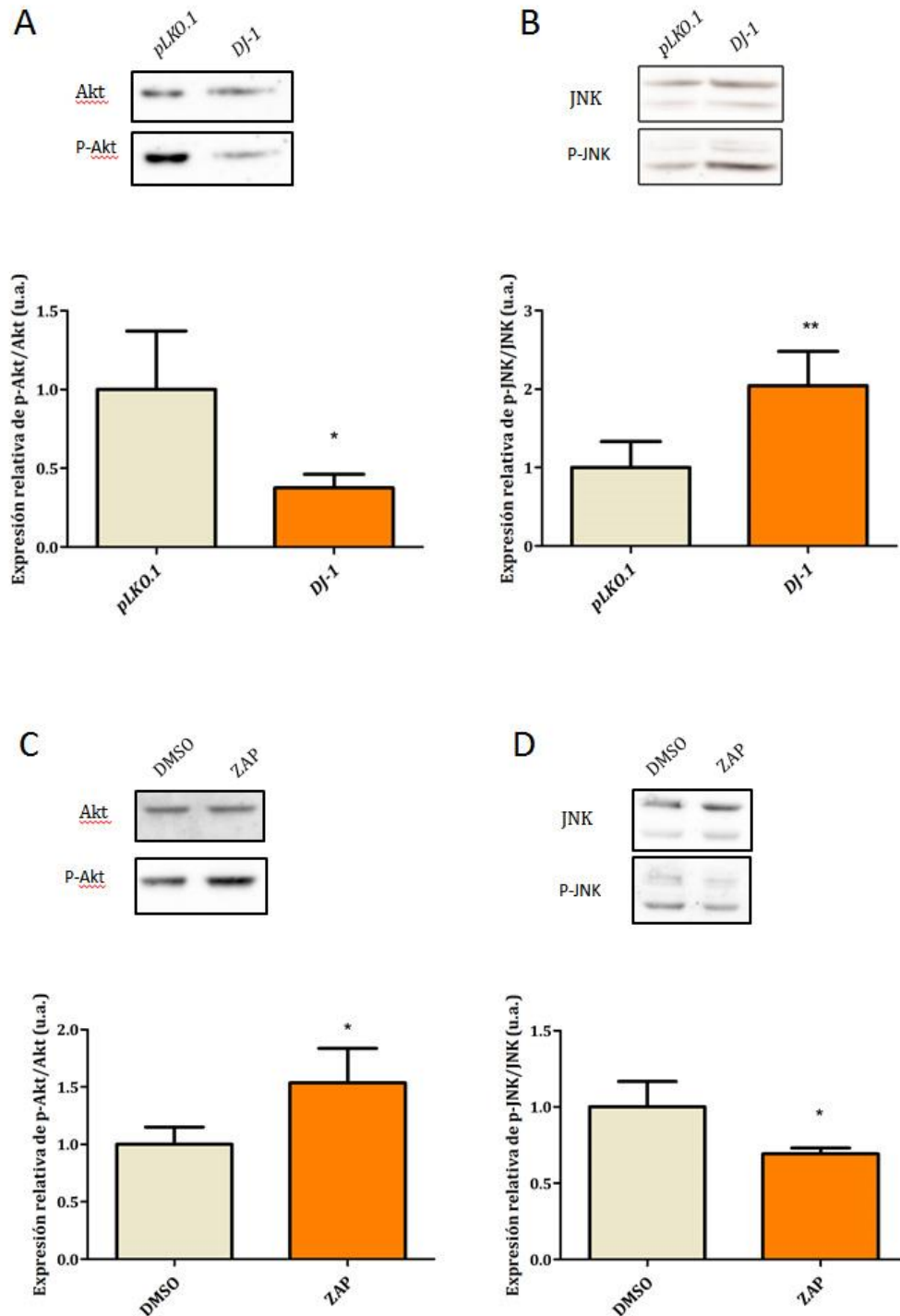


Figura 15. Efecto del ZAP sobre la expresión de las proteínas Akt y JNK en células mutantes DJ-1. La expresión de las proteínas (A) Akt, p-Akt, (B) JNK y p-JNK se midió en células *plko.1* y células mutantes *DJ-1* tras ser sometidas a EO mediante la adición de H₂O₂ a una concentración final de 100 μ M. La expresión de las proteínas (C) Akt, p-Akt, (D) JNK y p-JNK se midió en células *DJ-1* tratadas

con medio vehículo (DMSO al 0.1%) o con 1 μM de ZAP tras ser sometidas a EO mediante la adición de H_2O_2 a una concentración final de 100 μM . Los paneles superiores muestran una imagen representativa de los resultados obtenidos en un western blot, mientras que las gráficas muestran la cuantificación de la expresión de las formas fosforiladas de las proteínas con respecto a las formas sin fosforilar. Las barras de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas. (*, p-valor<0.05; **, p-valor<0.01).

4.1.1.3. El zaprinast aumenta la viabilidad mitocondrial en células mutantes *DJ-1*

Las alteraciones mitocondriales han sido ampliamente relacionadas con la aparición y el desarrollo de la EP (Park et al., 2018). De acuerdo con esto, algunos estudios han demostrado que la falta o la reducción de la función de *DJ-1* provoca una disminución de la masa mitocondrial, y afecta su morfología y funcionalidad (Andres-Mateos et al., 2007; Krebiehl et al., 2010; Zhang et al., 2019). Curiosamente, estas alteraciones mitocondriales encontradas en las células mutantes *DJ-1* pueden estar relacionadas con una reducción de la vía de Akt y un incremento de la de JNK (Heslop et al., 2020; Zhang et al., 2019). Dado que en este trabajo encontramos que el ZAP era capaz de afectar a estas dos vías, decidimos estudiar si esto conducía a un aumento de la viabilidad mitocondrial utilizando la sonda fluorescente *MitoTracker™ Red FM*. Los resultados obtenidos mostraron que las células mutantes *DJ-1* presentan unos niveles de fluorescencia reducidos en comparación con las células control (Fig. 16). Además, también encontramos que los niveles de fluorescencia eran mayores en células mutantes *DJ-1* tratadas con ZAP que en células sin tratar (Fig. 16). Este resultado demuestra que el tratamiento con ZAP consigue reducir las alteraciones mitocondriales encontradas en el modelo celular de la EP y aumentar su viabilidad.

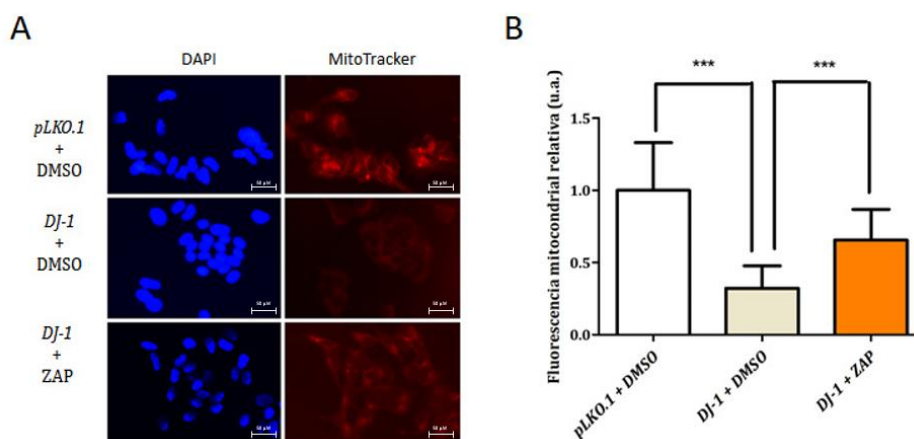


Figura 16. Efecto de ZAP sobre la viabilidad mitocondrial en células mutantes *DJ-1*. La viabilidad mitocondrial se analizó mediante el uso de la sonda fluorescente *MitoTracker Red FM* (rojo), que tiñe específicamente las mitocondrias, y la sonda fluorescente DAPI (azul), que tiñe específicamente los núcleos. (A) Imagen representativa de la señal de fluorescencia obtenida por

microscopía en un cultivo de células mutantes *DJ-1*. Barra de escala = 50 μm . (B) Representación gráfica de la señal de fluorescencia obtenida con la sonda *MitoTracker Red FM*. Los valores indican fluorescencia mitocondrial relativa, referenciándose al valor obtenido en las células control (*pLKO.1*) cultivadas en medio vehículo (DMSO al 0.1%). Se analizaron al menos 10 imágenes de cada condición. Las barras de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas. (***, p-valor<0.001).

4.1.1.4. El zaprinast aumenta la actividad de enzimas clave de la glucólisis en células mutantes *DJ-1*

Estudios recientes han demostrado que las alteraciones metabólicas pueden jugar un papel clave en la EP (Anandhan et al., 2017; Shukla et al., 2016; Solana-Manrique et al., 2020). De hecho, se ha visto que la falta de función de *DJ-1* produce un aumento de la glucólisis (Solana-Manrique et al., 2020). Además, se ha propuesto que este aumento puede ser un mecanismo compensatorio para incrementar los niveles de ATP, que están reducidos en mutantes *DJ-1* debido a las alteraciones mitocondriales (Requejo-Aguilar & Bolaños, 2016). Un estudio llevado a cabo en cultivos primarios de mesencéfalo de embriones de ratón mutantes para el gen *DJ-1* ha demostrado que éstos presentan unos niveles reducidos de ATP en comparación con ratones salvajes (Chen et al., 2019). Por tanto, a pesar de este aumento de la ruta glucolítica, los niveles de ATP no se conseguirían restaurar completamente. La actividad de esta ruta puede estimarse mediante la cuantificación de la actividad de las enzimas que participan en ella (Teslaa & Teitell, 2014). Estudios previos realizados por nuestro grupo demostraron que las células deficientes en el gen *DJ-1* presentan un aumento en la actividad de las enzimas hexoquinasa (Hk), fosfofructoquinasa (Pfk), enolasa (Eno) y piruvato quinasa (Pk) en comparación con las células control (Solana-Manrique et al., 2020). Además, varios estudios realizados en varios modelos de la EP han evidenciado que un aumento de la ruta glucolítica presenta efectos beneficiosos y puede considerarse una diana terapéutica para el tratamiento de la enfermedad (Cai et al., 2019; Solana-Manrique et al., 2020). Por lo tanto, decidimos estudiar si el ZAP podría ejercer algún efecto sobre la glucólisis. Para ello, cuantificamos la actividad de las enzimas mencionadas anteriormente en las células mutantes *DJ-1* tratadas con ZAP, encontrando un aumento de las actividades de Hk, Eno y Pk, y ninguna diferencia en la actividad de Pfk (Fig. 17A). Además, también encontramos que las células *DJ-1* presentan niveles elevados de ATP en comparación con las células control, y que el tratamiento con ZAP produce un aumento de dichos niveles (Fig. 17B), lo que confirmaría la hipótesis de que el aumento de la glucólisis tiene como objetivo el de restaurar los niveles de ATP (Solana-Manrique et al., 2020). Curiosamente, estudios previos han demostrado que el receptor GPR35 es capaz de promover la glucólisis a través de la activación de la ATPasa Na/K (Schneditz et al., 2019), y que el ZAP puede estar aumentando la absorción de glucosa mediada por insulina en músculo esquelético a través de su actividad inhibitoria de PDE de GMPc (Genders et al., 2011).

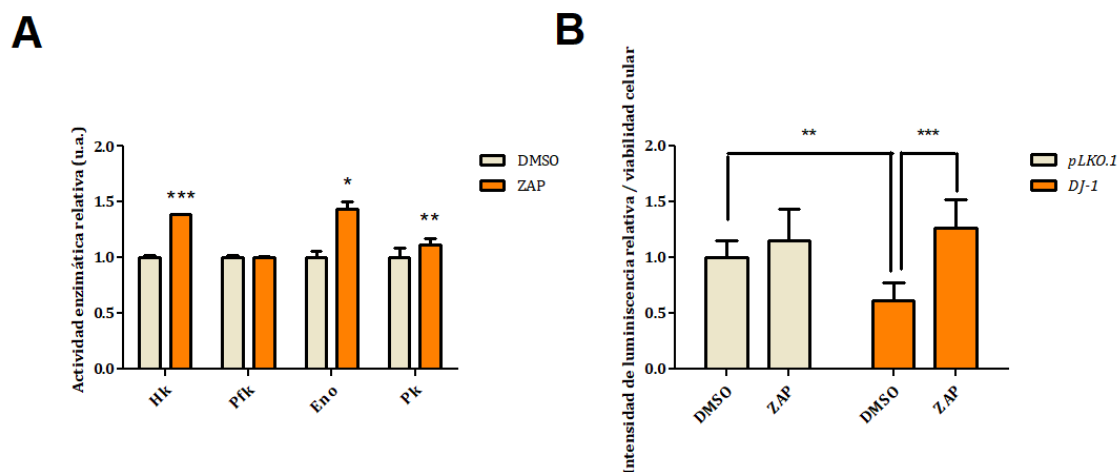


Figura 17. Efecto del ZAP sobre la glucólisis y los niveles de ATP en células mutantes *DJ-1*. (A) La actividad de las enzimas hexoquinasa (Hk), fosfofructoquinasa (Pfk), enolasa (Eno) y piruvato quinasa (Pk) se midió mediante reacciones acopladas en células *DJ-1* tratadas con medio vehículo (DMSO al 0.1%) o con 1 μ M de ZAP, en condiciones de EO mediante la adición de H_2O_2 a una concentración final de 50 μ M. Los resultados se muestran como actividad enzimática relativa, referenciándose al valor obtenido en células cultivadas en medio vehículo. (B) Los niveles de ATP se midieron usando el kit *ATP Determination KIT* (Invitrogen) en células *pLKO.1* y *DJ-1* tratadas con medio vehículo (DMSO al 0.1%) o con una concentración de 1 μ M de ZAP, en condiciones de EO mediante la adición de H_2O_2 a una concentración final de 50 μ M. Los resultados se muestran como intensidad de luminiscencia relativa/viabilidad celular, referenciándose al valor obtenido en las células *pLKO.1* cultivadas en medio vehículo. Las barras de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas. (*, p-valor<0.05; **, p-valor<0.01; ***, p-valor<0.001).

4.1.1.5. El CID2745687, un antagonista del receptor GPR35, reduce el efecto neuroprotector del zaprinast en células mutantes *DJ-1*

Se ha descrito que el ZAP es un compuesto con dos dianas diferentes, ya que puede actuar como inhibidor de PDE y como agonista del receptor GPR35 (Medina, 2011; Taniguchi et al., 2006). El efecto de los inhibidores de las PDE ha sido ampliamente estudiados en modelos de la EP, e incluso se han propuesto como potenciales candidatos para su tratamiento (Nthenge-Ngumbau & Mohanakumar, 2018). Sin embargo, existen muy pocos estudios sobre la relación del receptor GPR35 con la EP y el efecto de su activación. Debido a ello, decidimos investigar si la activación del receptor GPR35 podría tener efecto neuroprotector. Lo primero que hicimos fue confirmar que las células SH-SY5Y expresaban el gen *GPR35* mediante RT-qPCR (resultados no mostrados). Posteriormente, estudiamos si la quinurenina (KYN) podría tener un efecto neuroprotector. La KYN es el precursor del ácido quinurénico, el cual se considera el ligando endógeno del receptor GPR35 (Fukuwatari, 2020). Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con KYN producía un ligero aumento de la viabilidad en las células *DJ-1* (Fig. 18A), lo que apoyaría la hipótesis de que la activación del receptor GPR35 podría tener un efecto beneficioso. Sin

embargo, hay que tener en cuenta que solo se utilizó una concentración de KYN. Por lo tanto, sería interesante estudiar su eficacia usando diferentes concentraciones, para poder confirmar su efecto neuroprotector. Esto apoyaría la hipótesis de que la activación del receptor GPR35 podría ser una potencial diana terapéutica para tratar la EP. Finalmente, para confirmar que ZAP estaba ejerciendo, al menos parcialmente, su efecto neuroprotector a través de la activación del receptor GPR35, estudiamos el efecto del CID2745687 (methyl-5-[(tertutylcarbamothioylhydrazinylidene)methyl]-1-(2,4-difluorophenyl) pyrazole-4-carboxylate) sobre la viabilidad de las células tratadas con ZAP. Este compuesto es uno de los pocos antagonistas del receptor GPR35 estudiados hasta la fecha (Quon et al., 2020). Los resultados obtenidos demostraron que el pretratamiento de las células *DJ-1* con CID2745687 reducía el efecto neuroprotector del ZAP (Fig. 18B), confirmando así nuestra hipótesis. Además, también comprobamos que el CID2745687 no tenía ningún efecto sobre la viabilidad las células control ni sobre las deficientes para *DJ-1* (Fig. 18C, D).

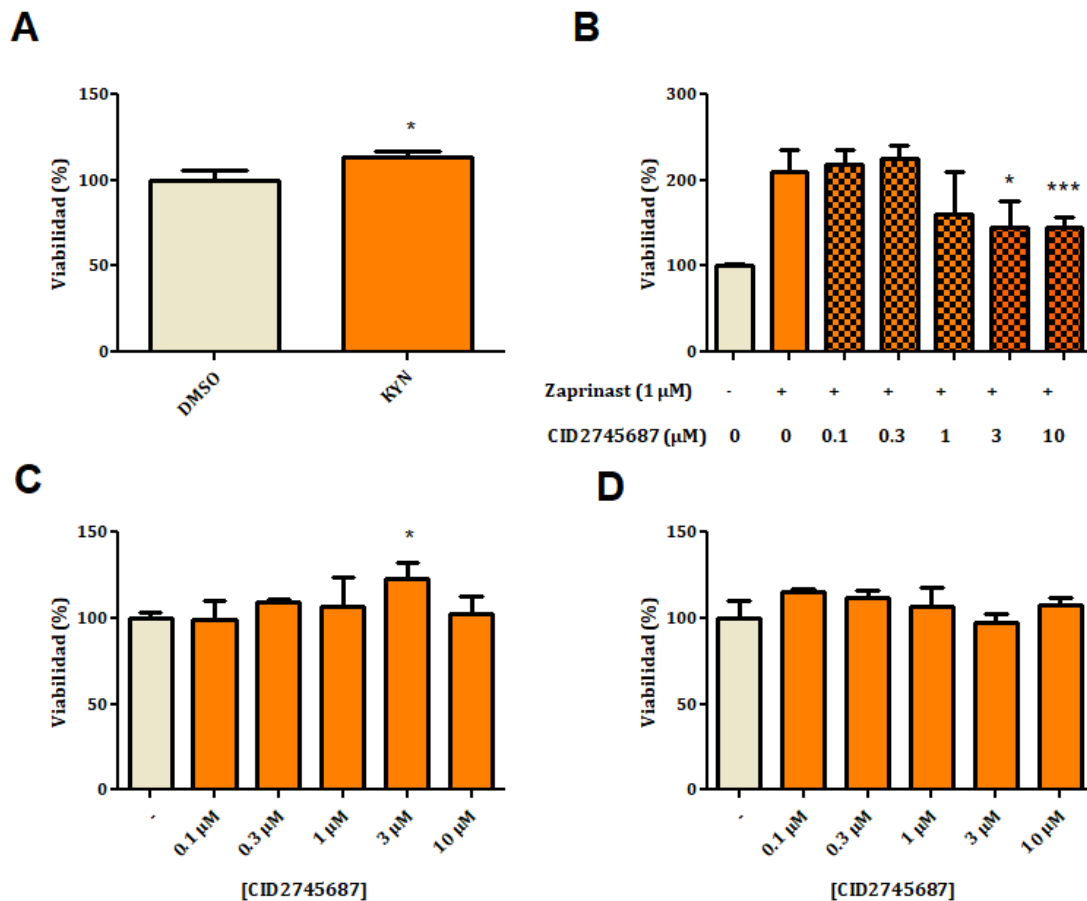


Figura 18. Efecto de la kynuremina y del CID2745687 en células SH-SY5Y. La viabilidad celular se midió mediante un ensayo de MTT en células SH-SY5Y tras ser sometidas a EO mediante la adición de H₂O₂ a una concentración final de 100 μM. Se estudió el efecto (A) de la kynuremina en células *DJ-1*, (B) del CID2745687 en células *DJ-1* tratadas con una concentración de 1 μM de ZAP, y (C) del CID2745687 en células control (*pLKO.1*) y (D) en células *DJ-1*. Los resultados están referenciados al valor obtenido en las células cultivadas en medio vehículo (DMSO al 0.1% (-)). Las barras de error

muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas. (*, p-valor<0.05; ***, p-valor<0.001).

4.1.2. Estudio del efecto de la vincamina en modelos de la enfermedad de Parkinson

Entre los compuestos candidatos identificados en el RGE, encontramos la vincamina (VIN). La VIN es un alcaloide indol mono-terpénico natural obtenido de las hojas de la planta *Vinca minor* (Fayed, 2010). Este compuesto se utiliza actualmente para tratar alteraciones de la memoria y el deterioro cognitivo (Abdel-Salam et al., 2016). De hecho, se ha descrito que la VIN es capaz de aumentar el flujo sanguíneo cerebral y el transporte de glucosa a las células (Abdel-Salam et al., 2016). Hasta la fecha, diferentes estudios han demostrado que la VIN puede actuar como un inhibidor de la PDE1, además de inhibir los canales de Na⁺ dependientes de voltaje (CNDV) y los canales de Ca²⁺ tipo L (Abdel-Salam et al., 2016; Sheref et al., 2021). Como se ha comentado previamente, los inhibidores de PDE han sido ampliamente estudiados y propuestos como compuestos candidatos para tratar la EP (Nthenge-Ngumbau & Mohanakumar, 2018). Debido a que la EP es una enfermedad multifactorial, se piensa que las estrategias terapéuticas para aliviar sus síntomas deberían estar dirigidas a tratar diferentes alteraciones encontradas en los pacientes (Bloem et al., 2021). Por lo tanto, dado que la VIN presenta diferentes dianas terapéuticas, algunas de ellas no relacionadas previamente con la EP, consideramos que era un candidato idóneo para ser estudiado en más profundidad.

4.1.2.1. La vincamina reduce los niveles de estrés oxidativo en moscas mutantes *DJ-1β*

Como se ha comentado previamente, el aumento de los niveles de EO parece jugar un papel importante en el desarrollo de la EP (Poewe et al., 2017; Sanz et al., 2017). Para estudiar si la VIN podría estar ejerciendo su efecto beneficioso a través de una reducción del EO, decidimos estudiar los niveles de varios marcadores de este tipo de estrés tras el tratamiento con el compuesto. Nuestros resultados mostraron que las moscas mutantes *DJ-1β* de 5 días de edad tratadas con una concentración de 10 μM de VIN desde estadios larvarios presentaban una reducción de los niveles de H₂O₂ y de carbonilación de proteínas en comparación con moscas de la misma edad sin tratar (Fig. 19).

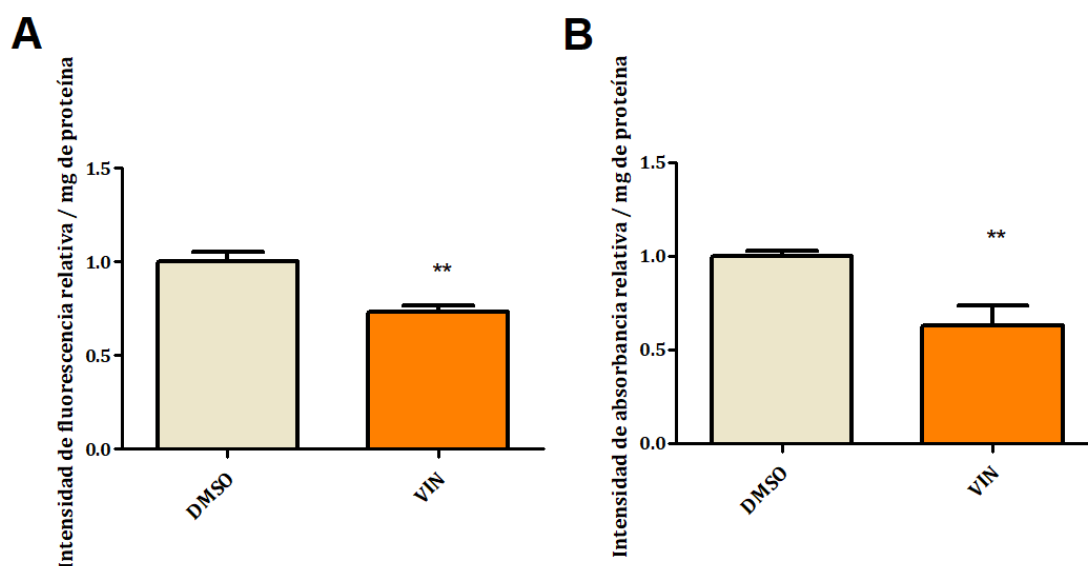


Figura 19. Efecto de la VIN sobre los niveles de EO en moscas mutantes *DJ-1β*. (A) Los niveles de H_2O_2 se midieron utilizando el kit *Amplex H_2O_2 Red Kit* (Invitrogen). Los resultados se muestran como intensidad de fluorescencia / mg de proteína, referenciándose al valor obtenido en moscas cultivadas en medio control (DMSO al 0.1%). (B) Los niveles de carbonilación de proteínas se midieron usando el compuesto DNPH. Los resultados se muestran como intensidad de absorbancia relativa / mg de proteína, referida al valor obtenido en moscas cultivadas en medio control (DMSO al 0.1%). Las barras de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas. (**, p-valor<0.01).

4.1.2.2. La vincamina aumenta la supervivencia en células mutantes *DJ-1* mediante la reducción de la activación de la vía de la JNK

Posteriormente, decidimos estudiar el efecto de la VIN en células mutantes *DJ-1*. En primer lugar, realizamos un ensayo de dosis para determinar la concentración a la que la VIN mostraba una mayor eficacia en mejorar la supervivencia celular. Para ello, realizamos un ensayo de viabilidad con MTT en células *DJ-1* sometidas a EO, usando diferentes concentraciones del compuesto (en un rango entre 0.1-80 μ M). Los resultados mostraron que la VIN era capaz de mejorar la supervivencia en el rango entre 2.5-20 μ M, siendo 10 μ M la concentración más eficaz (Fig. 20A). Por lo tanto, todos los experimentos realizados a continuación se llevaron a cabo utilizando una concentración de 10 μ M de VIN. Además, también realizamos el mismo ensayo usando células control sometidas a EO, encontrando que ninguna de las concentraciones de VIN utilizadas tenían efecto alguno sobre la viabilidad celular (Fig. 20B).

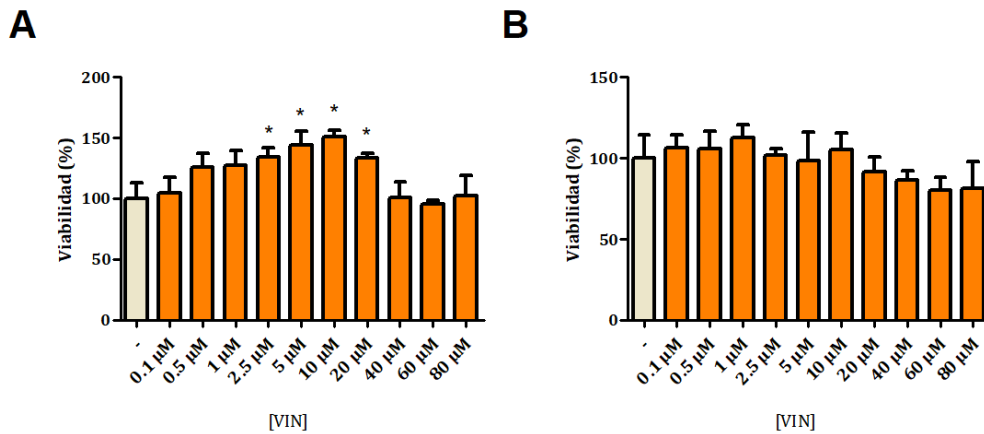


Figura 20. Efecto de la VIN sobre la viabilidad en el modelo celular humano. La viabilidad se midió mediante un ensayo de MTT en las células (A) *DJ-1* y (B) *plk0.1* tras ser sometidas a EO mediante la adición de H_2O_2 a una concentración final de $100 \mu M$, y pretratadas con diferentes concentraciones de VIN. Los resultados están referenciados al valor obtenido en las células cultivadas en medio vehículo (DMSO al 0.1% (-)). Las barras de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas. (*, p-valor<0.05).

Como se ha comentado en el apartado 4.1.1.2, la activación de la ruta apoptótica parece jugar un papel importante en la muerte neuronal (Erekat, 2018). Con el objetivo de estudiar si la VIN podría actuar mediante la modificación de esta ruta, decidimos cuantificar los niveles de expresión y fosforilación de las proteínas Akt y JNK, implicadas en la reducción y el aumento de la apoptosis, respectivamente. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con VIN no tenía ningún efecto sobre la fosforilación de Akt en las células *DJ-1* (Fig. 21A); sin embargo, sí que consiguió reducir la activación del factor proapoptótico JNK (Fig. 21B).

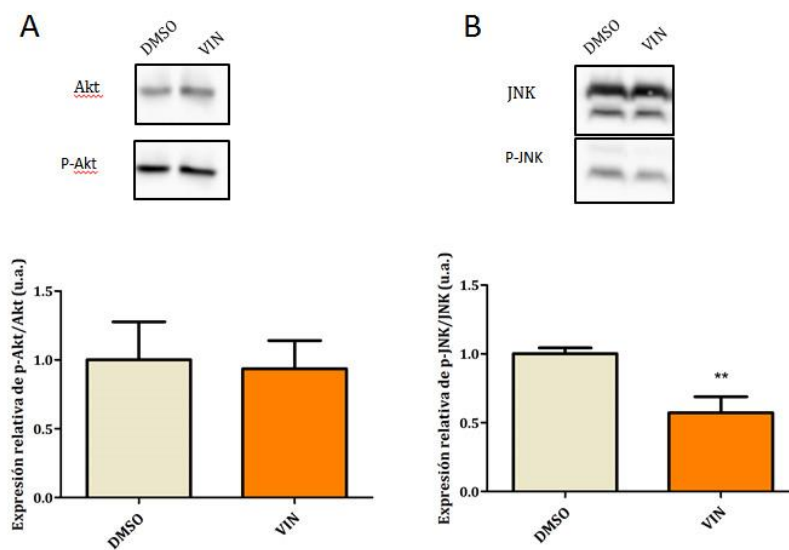


Figura 21. Efecto de la VIN sobre las proteínas Akt y JNK en células mutantes *DJ-1*. La expresión de las proteínas (A) Akt y p-Akt, y (B) JNK y p-JNK se midió en células *DJ-1* tratadas con medio control

(DMSO al 0.1%) o con 10 μM de VIN, tras ser sometidas a EO mediante la adición de H_2O_2 a una concentración final de 100 μM . Los paneles superiores muestran una imagen representativa de los resultados obtenidos en un western blot, mientras que las gráficas muestran la cuantificación de la expresión de las proteínas fosforiladas referidas a la expresión de las proteínas sin fosforilar. Las barras de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas. (**, p-valor<0.01).

4.1.2.3. La vincamina aumenta la viabilidad mitocondrial y reduce los niveles de ROS en células mutantes *DJ-1*

Como hemos comentado previamente, el mantenimiento de la integridad y de la función mitocondrial es esencial para el buen funcionamiento de las neuronas (Aryal & Lee, 2019), y que la mutación del gen *DJ-1* produce alteraciones tanto morfológicas como funcionales (Andres-Mateos et al., 2007; Krebiehl et al., 2010; Zhang et al., 2020), Debido a ello, decidimos estudiar si la VIN era capaz de suprimir alguna de estas alteraciones. Para ello, cuantificamos la masa mitocondrial usando la sonda fluorescente *MitoTrackerTM Red FM*. De acuerdo con un estudio previo realizado por nuestro grupo (Fig. 16) (Sanz et al., 2021), encontramos que las células *DJ-1* presentaban unos niveles de fluorescencia menores que las células control *pLKO.1*, lo que confirma que estas células presentan alteraciones mitocondriales (Fig. 22). Además, también encontramos que las células *DJ-1* tratadas con VIN mostraban unos niveles de fluorescencia mayores que las células sin tratar, lo que se relaciona con un aumento de la masa mitocondrial (Fig. 22).

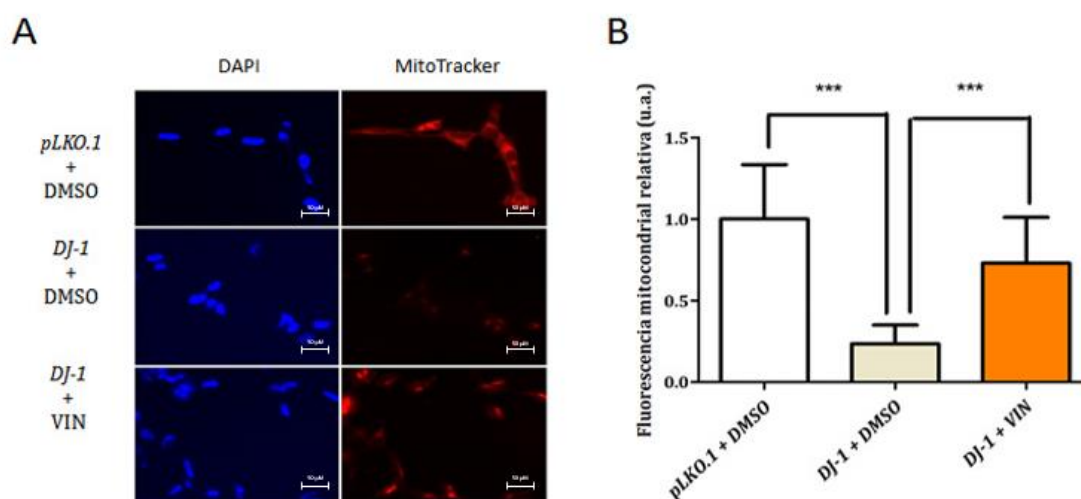


Figura 22. Efecto de la VIN sobre la viabilidad mitocondrial en células mutantes *DJ-1*. La viabilidad mitocondrial se analizó mediante el uso de la sonda fluorescente *MitoTracker Red FM* (rojo), que tiñe específicamente las mitocondrias, y la sonda fluorescente DAPI (azul), que tiñe los núcleos. (A) Imagen representativa de la señal de fluorescencia obtenida por microscopía en un cultivo de células. Barra de escala = 50 μm . (B) Representación gráfica de la señal de fluorescencia obtenida con la sonda *MitoTracker Red FM*. Los valores se representan como fluorescencia mitocondrial relativa, referenciándose al valor obtenido en las células control (*pLKO.1*) cultivadas en medio vehículo (DMSO al 0.1%). Se analizaron al menos 10 imágenes de cada condición. Las barras

de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas. (***, p-valor<0.001).

Por otra parte, se ha descrito que las mitocondrias son una de las fuentes principales de ROS en las células. De hecho, alteraciones en su función conduce a un aumento importante en los niveles de ROS celulares (Zorov et al., 2014). Con el objetivo de estudiar si las alteraciones mitocondriales en el modelo celular de la EP conducen a un aumento de los niveles de ROS, y evaluar si la VIN podría reducir sus niveles, utilizamos la sonda fluorescente Dihidroetidio (también llamado hidroetidina), la cual permite cuantificar los niveles de O_2^- (un componente del *pool* de ROS). Nuestros resultados mostraron que las células *DJ-1* presentaban niveles elevados de fluorescencia en comparación con las células control (*pLKO.1*) (Fig. 23). Además, también demostramos que el tratamiento de las células *DJ-1* con VIN provocaba una reducción de los niveles de ROS en comparación con células sin tratar (Fig. 23). Estos resultados demuestran que la VIN es capaz de ejercer un efecto beneficioso mediante un aumento de la actividad mitocondrial, que a su vez puede repercutir en un descenso de los niveles de ROS.

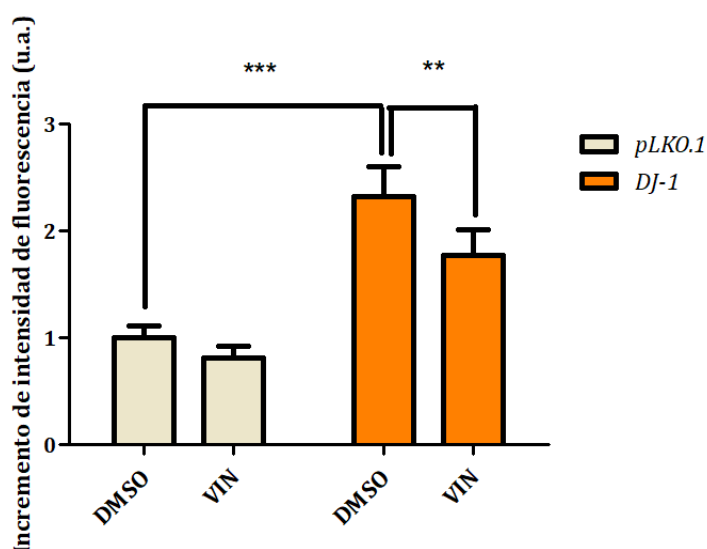


Figura 23. Efecto de la VIN sobre los niveles de ROS en el modelo de la EP en células SH-SY5Y. Los niveles de O_2^- se midieron usando la sonda fluorescente Dihidroetidio (Invitrogen) en células *DJ-1* tratadas con 10 μ M de VIN o sin tratar (DMSO al 0.1%) en condiciones de EO, mediante la adición de H_2O_2 a una concentración final de 100 μ M. Los resultados están referenciados al valor obtenido en las células control (*pLKO.1*) cultivadas en medio vehículo (DMSO al 0.1%). Las barras de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas (**, p-valor<0.01; ***, p-valor<0.001).

4.1.2.4. La veratridina, un activador de los canales de Na^+ dependientes de voltaje, reduce el efecto neuroprotector de vincamina en células mutantes *DJ-1*

La VIN es un compuesto que puede actuar sobre diferentes dianas (ver apartado 4.1.2). En este trabajo decidimos enfocarnos en su actividad como inhibidor de los CNDV (Abdel-Salam et al., 2016). Estudios recientes han demostrado que estos canales están sobreexpresados en modelos murinos de la EP (Liu et al., 2021; Wang et al., 2019). Además, se ha visto que el tratamiento con fenitoína, un inhibidor de los CNDV, consigue mejorar los síntomas motores y cognitivos en un modelo de ratón de la EP (Liu et al., 2021). Por ello, decidimos estudiar si la VIN podría estar ejerciendo un efecto neuroprotector en nuestros modelos de la EP a través de la inhibición de esos canales. Para ello, utilizamos la veratridina, un compuesto que activa los CNDV, lo que inhibiría el efecto que tiene la VIN en estos canales (Felix et al., 2004). En primer lugar, estudiamos si el tratamiento con este compuesto podía afectar la viabilidad de las células control (*pLKO.1*) o de las mutantes *DJ-1*, encontrando que presentaba efectos tóxicos a partir de 150 μM en ambos casos (Fig. 24A, B). Posteriormente, estudiamos el efecto de la veratridina en las células *DJ-1* tratadas con VIN. Para ello, utilizamos la concentración más alta de veratridina que no producía efectos tóxicos (100 μM). Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con veratridina reducía ligeramente el efecto beneficioso de la VIN (Fig. 24C), lo que sugiere que este compuesto estaría ejerciendo un efecto neuroprotector a través de la inhibición de los CNDV.

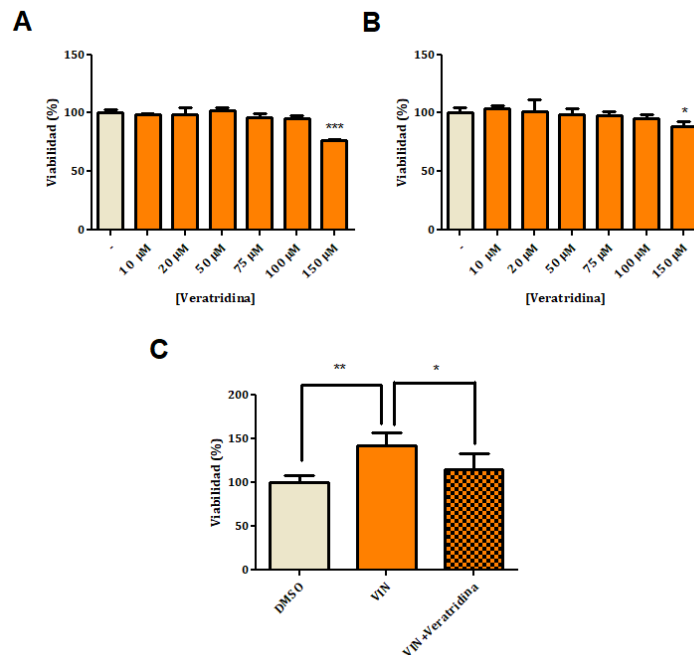


Figura 24. Efecto de la veratridina en células SH-SY5Y. La viabilidad celular se midió mediante un ensayo de MTT en células SH-SY5Y tras ser sometidas a EO, mediante la adición de una concentración final de 100 μM de H_2O_2 . Se estudió el efecto de veratridina en (A) células *pLKO.1*, (B) células *DJ-1* y (C) células *DJ-1* tratadas con 10 μM de VIN. Los resultados están referenciados al valor obtenido en las células cultivadas en medio vehículo (DMSO al 0.1% (-)). Las barras de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas. (*, p-valor<0.05; **, p-valor<0.01; ***, p-valor<0.001).

4.1.3. Estudio del efecto de otros compuestos identificados en el rastreo a gran escala

Además de los compuestos ya mencionados, identificamos otros candidatos que presentan mecanismos de acción interesantes y que, por lo tanto, deberían ser estudiados en más profundidad para evaluar su eficacia como posibles tratamientos para la EP. Entre ellos, destacan el ácido retinoico (AR) y la fentolamina (FEN). El estudio de estos compuestos se encuentra todavía en fases preliminares. A continuación, se exponen brevemente los resultados obtenidos con estos hasta la fecha.

4.1.3.1. Ácido retinoico

El AR es un derivado de la vitamina A que juega un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso de mamíferos, y en la supervivencia y maduración neuronal (Esteves et al., 2015). Existen algunos estudios en los que se ha analizado el efecto de este compuesto en modelos de la EP. Por ejemplo, se ha visto que el AR es capaz de reducir la pérdida de neuronas DA en modelos de la EP en ratón y rata (Esteves et al., 2015; Yin et al., 2012), y de reducir los defectos motores en el modelo de rata (Yin et al., 2012). Nuestro primer objetivo fue comprobar si el AR podría ser efectivo en otros modelos de la EP en *Drosophila*, además de los mutantes *DJ-1 β* . Para ello, utilizamos las moscas mutantes *park*, encontrando que el tratamiento con AR era capaz de reducir los defectos motores que éstas presentaban (Fig. 25A). Posteriormente, analizamos el efecto de este compuesto en nuestro modelo celular de la EP. En primer lugar, quisimos identificar cuál era la concentración más efectiva del AR en las células mutantes *DJ-1* sometidas a EO. Para ello, realizamos un ensayo de viabilidad con MTT pretratando las células con diferentes concentraciones de AR (en un rango entre 5-80 μ M), y encontramos que el compuesto mejoraba la viabilidad de las células *DJ-1* en el rango entre 10-60 μ M, siendo 20 μ M la concentración más efectiva (Fig. 25B). Estos resultados, junto con los obtenidos por otros grupos, confirman que el AR puede ser un compuesto candidato para tratar la EP. Sin embargo, se necesitarán experimentos adicionales para comprobar si el AR es capaz de modificar otros fenotipos relacionados con la enfermedad, y para identificar los mecanismos de acción por los que lleva a cabo su efecto beneficioso.

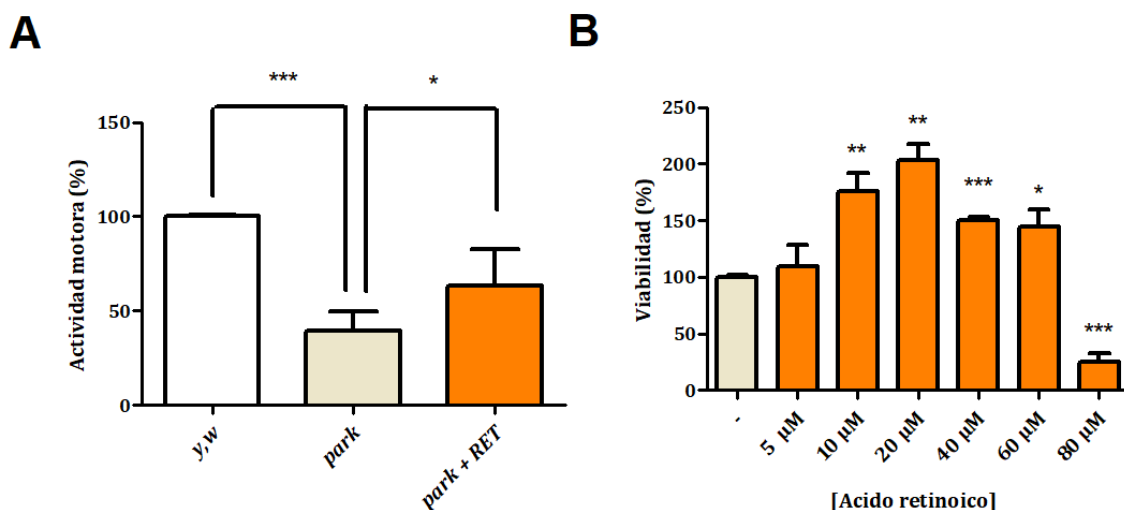


Figura 25. Efecto del AR en modelos de la EP. (A) La actividad motora de las moscas mutantes *park* se evaluó mediante la realización de un ensayo de escalada. Los resultados se referenciaron al valor obtenido en las moscas control (*y,w*) cultivadas en medio control (DMSO al 0.1%). (B) La viabilidad se midió mediante un ensayo de MTT en células *DJ-1* tras ser sometidas a EO mediante la adición de H₂O₂ a una concentración final de 100 μM. Los resultados están referenciados al valor obtenido en células cultivadas en medio vehículo (DMSO al 0.1% (-)). Las barras de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas. (*, p-valor<0.05; **, p-valor<0.01; ***, p-valor<0.001).

4.1.3.2. Fentolamina

La fentolamina (FEN) es un bloqueante no selectivo de los receptores α -adrenérgicos (Li et al., 2022). Hasta la fecha, no se ha realizado ningún estudio para evaluar la posible eficacia de este compuesto en modelos de la EP, por lo que podría suponer una estrategia novedosa para tratar la enfermedad. Los estudios realizados con este compuesto han sido los mismos que los mencionados anteriormente con el AR. Concretamente, Nuestros resultados mostraron que la FEN es capaz de reducir los defectos motores de las moscas mutantes *park* (Fig. 26A). Además, también realizamos un ensayo de dosis con el fin de encontrar la dosis más eficaz de FEN en nuestro modelo celular de la EP. Estudiamos el efecto de un pretratamiento con FEN a diferentes concentraciones (entre 10-200 μM) sobre la viabilidad de las células mutantes *DJ-1* sometidas a EO. Nuestros resultados muestran que la FEN es capaz de aumentar la viabilidad de esas células en un rango de concentraciones entre 20-200 μM, siendo 200 μM la concentración más efectiva (Fig. 26B). Al igual que con el AR, se necesitarán realizar experimentos adicionales para poder confirmar su eficacia como tratamiento para la EP.

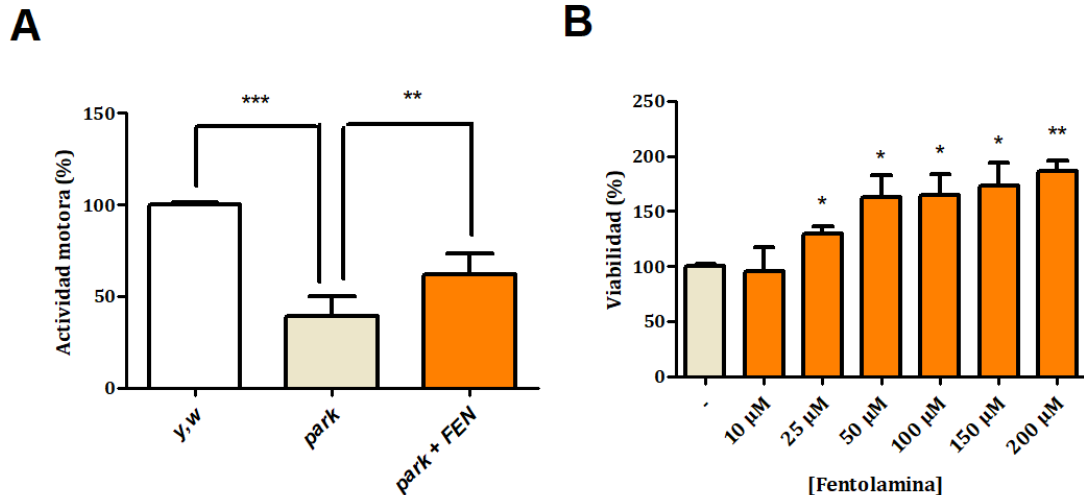


Figura 26. Efecto de la FEN en modelos de la EP. (A) La actividad motora se de las moscas mutantes *park* se evaluó mediante la realización de un ensayo de escalada. Los resultados se referenciaron al valor obtenido en las moscas control (*y,w*) cultivadas en medio control (DMSO al 0.1%). (B) La viabilidad se midió mediante un ensayo de MTT en las células *DJ-1* tras ser sometidas a EO mediante la adición de H_2O_2 a una concentración final de 100 μ M. Los resultados están referenciados al valor obtenido en las células cultivadas en medio vehículo (DMSO al 0.1% (-)). Las barras de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas. (*, p-valor<0.05; **, p-valor<0.01; ***, p-valor<0.001).

4.2. Estudio de la relación entre la enfermedad de Parkinson y la Diabetes Mellitus tipo 2

4.2.1. Análisis de los niveles de carbohidratos en modelos de la enfermedad de Parkinson en *Drosophila*

Las causas de la aparición de la EP son aún desconocidas. Sin embargo, estudios recientes están demostrando que las alteraciones metabólicas pueden jugar un papel muy importante en este proceso (Anandhan et al., 2017). De acuerdo con esto, nuestro grupo ha publicado recientemente varios estudios en los que se demuestra que las moscas mutantes *DJ-1 β* presentan un aumento de la ruta glucolítica, así como alteraciones en los niveles de varios metabolitos en comparación con moscas control (Solana-Manrique et al., 2020, 2022). Entre los metabolitos alterados, encontramos la trehalosa, cuyos niveles presentaban un gran aumento en las moscas modelo. La trehalosa es un disacárido no reductor y, curiosamente, es el principal azúcar circulante de la hemolinfa de *Drosophila* (Solana-Manrique et al., 2022; Yasugi et al., 2017). Con el objetivo de estudiar otras posibles alteraciones de metabolitos relacionados, decidimos medir los niveles de carbohidratos solubles y glucógeno utilizando el reactivo antrona. Los resultados obtenidos mostraron que las moscas mutantes *DJ-1 β* de 15 días de edad presentaban niveles elevados tanto de carbohidratos solubles como de glucógeno en comparación con las moscas control *y,w* (Fig. 27A, B), lo cual se puede producir por un cambio en el modo de

obtención de energía, pasando del CAC a la glucólisis (Liesa & Shirihai, 2013; Wu et al., 2017). De acuerdo con esto, nuestro grupo ha demostrado recientemente que las moscas *DJ-1β* muestran un aumento en la actividad de enzimas clave de la glucólisis, así como una reducción de la actividad de algunas de las enzimas del CAC (Solana-Manrique et al., 2020, 2022).

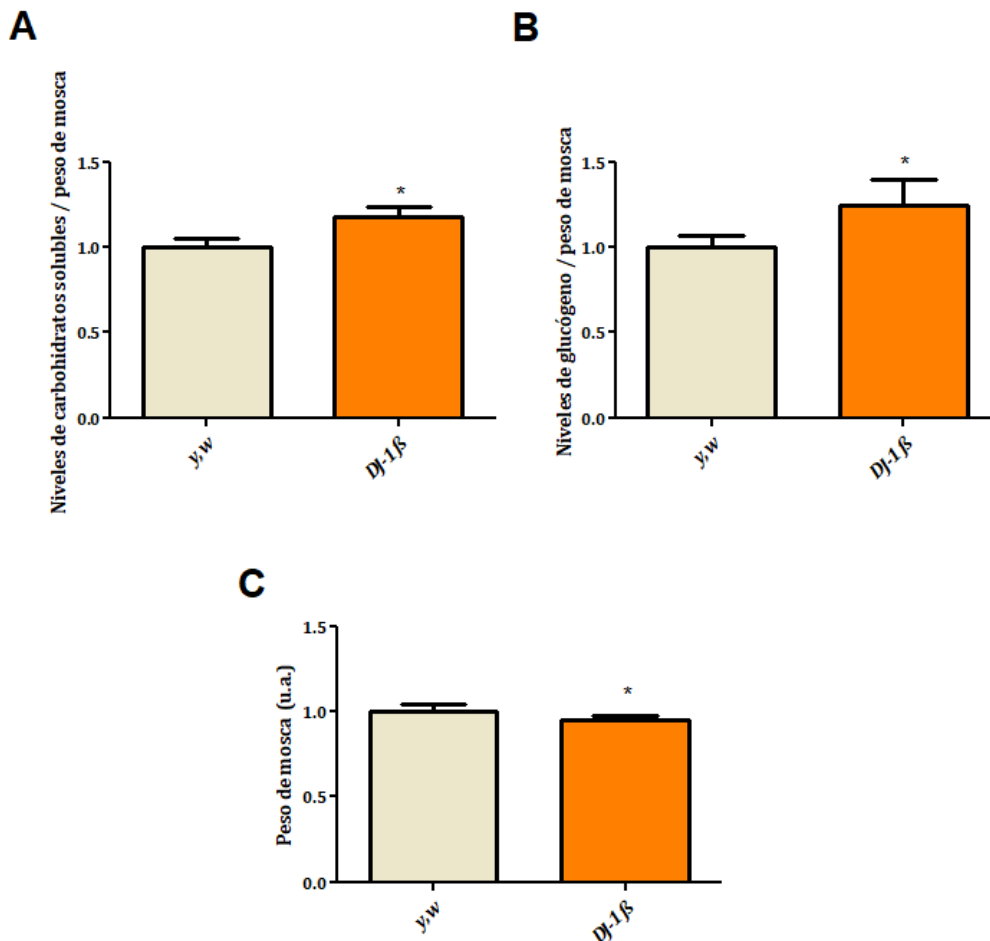


Figura 27. Alteraciones metabólicas en moscas mutantes *DJ-1β*. Los niveles de (A) carbohidratos solubles y (B) glucógeno se midieron utilizando el reactivo antrona en moscas control (*y,w*) y *DJ-1β* de 15 días de edad. (C) Peso de moscas control (*y,w*) y *DJ-1β* de 15 días de edad. Los resultados están referenciados al valor obtenido en las moscas control. Las barras de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas en A y B, y de al menos 6 experimentos independientes en C (*, p-valor<0.05).

Posteriormente, decidimos estudiar si estas alteraciones también estaban presentes en otros modelos de la EP. Para ello utilizamos un modelo de la EP inducido químicamente por exposición a rotenona, al cual se considera un modelo de EPe (Coulom & Birman, 2004). Los resultados obtenidos mostraron que las moscas tratadas con rotenona también presentaban un aumento de los niveles de carbohidratos solubles y de glucógeno (Fig. 28A, B), así como una ligera reducción del peso en comparación con moscas sin tratar (Fig. 28C). Estos resultados

demuestran que las alteraciones encontradas en las moscas *DJ-1 β* no son específicas de este modelo de EPf.

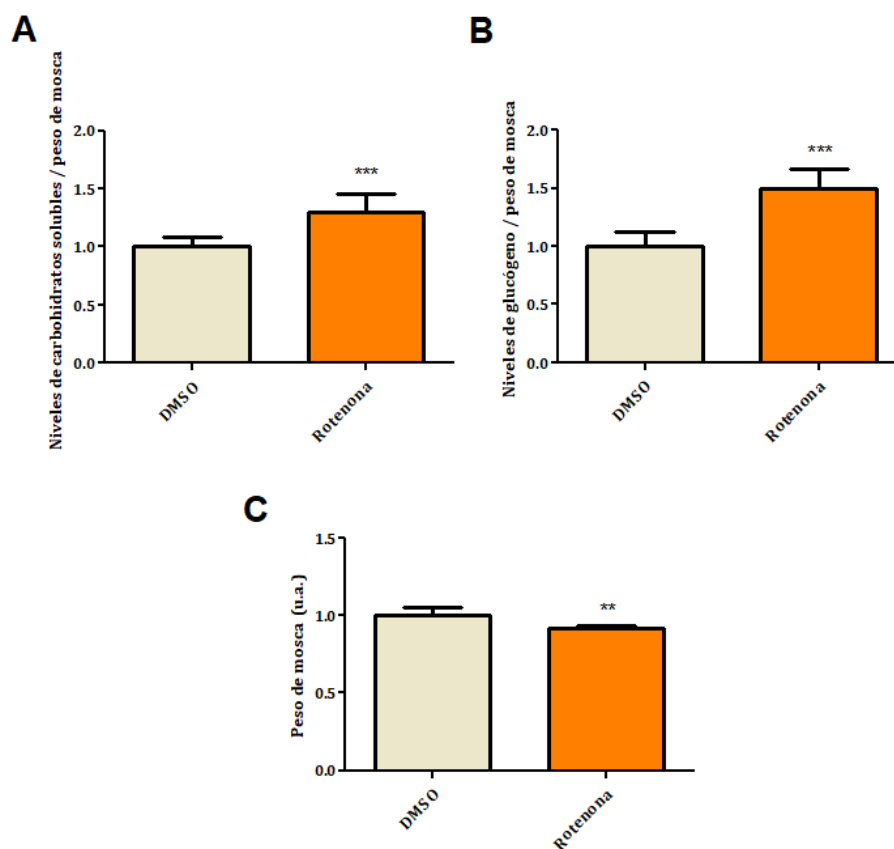


Figura 28. Alteraciones metabólicas en un modelo de la EPe en *Drosophila* inducido con rotenona. Los niveles de (A) carbohidratos solubles y (B) glucógeno se midieron utilizando el reactivo antrona en moscas *y,w* de 15 días de edad cultivadas en medio control (DMSO al 0.1%) o con rotenona. (C) Peso de las moscas *y,w* de 15 días de edad cultivadas en medio control (DMSO al 0.1%) o con rotenona. Los resultados están referenciados al valor obtenido en las moscas cultivadas en medio control. Las barras de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas en A y B, y de al menos 6 experimentos independientes en C (**, p-valor<0.01; ***, p-valor<0.001).

4.2.2. Alteraciones en el metabolismo de carbohidratos en moscas modelo de la Diabetes Mellitus tipo 2

La DMT2 se caracteriza por unos niveles elevados de glucosa en sangre (Zhang et al., 2021). Los resultados obtenidos por nuestro grupo en el modelo de la EP en *Drosophila*, tanto el aumento en los niveles de trehalosa (Solana-Manrique et al., 2022), como los niveles de carbohidratos soluble y glucógeno (Fig. 27A, B), nos hicieron preguntarnos si podría existir alguna relación entre ambas enfermedades. De hecho, varios grupos han incidido ya en este tema. Algunos estudios epidemiológicos han demostrado que puede haber una relación entre la EP y la DMT2; sin embargo, aún se desconocen las causas subyacentes a dicha relación

(Fiory et al., 2019; Sharma et al., 2021). Con el objetivo de estudiar en profundidad la relación entre la DMT2 y la EP, decidimos utilizar moscas modelo de la DMT2, y caracterizarlas fenotípicamente. De entre los diversos modelos de la DMT2 que han sido descritos en *Drosophila* (Liguori et al., 2021), optamos por utilizar uno basado en el cultivo de moscas salvajes en un medio que contiene una concentración de azúcar 6 veces mayor (HSD, de *high sugar diet*) que el medio de cultivo estándar (ND, de *normal diet*). Estudios previos han demostrado que estas moscas modelo desarrollan resistencia a insulina, lo cual es un signo característico de la DMT2 (Morris et al., 2012). Inicialmente, decidimos comprobar si las moscas modelo de la DMT2 presentaban alteraciones en los niveles de carbohidratos. Nuestros resultados demostraron que las moscas cultivadas en HSD de 15 días de edad presentan niveles elevados de carbohidratos solubles y de glucógeno en comparación con moscas cultivadas en ND (Fig. 29A, B). Además, también encontramos que las moscas modelo de la DMT2 presentaban una expresión aumentada de *Ilp2* (Fig. 29C), uno de los tres genes *Ilps* implicados en la homeostasis de la glucemia en *Drosophila* junto con *Ilp3* y *Ilp5* (Gáliková & Klepsatel, 2018). Sin embargo, los genes *Ilp3* y *Ilp5* no presentaron ninguna diferencia en su expresión en las moscas modelo de la DMT2 en comparación con moscas cultivadas en ND. El aumento de *Ilp2* confirma la presencia de resistencia a insulina (Pasco & Léopold, 2012). Además, nuestros resultados también mostraron un aumento de la expresión de los genes *InR*, *PI3K* y *chico* (Fig. 29D), tres genes que forman parte de la RSI. El aumento en la expresión de genes de esta ruta suele ser indicativo de una reducción de su actividad (Pasco & Léopold, 2012). En resumen, el aumento de los niveles de carbohidratos, la presencia de resistencia a insulina y el descenso en la actividad de la RSI confirman que las moscas utilizadas en este estudio son un modelo idóneo de la DMT2.

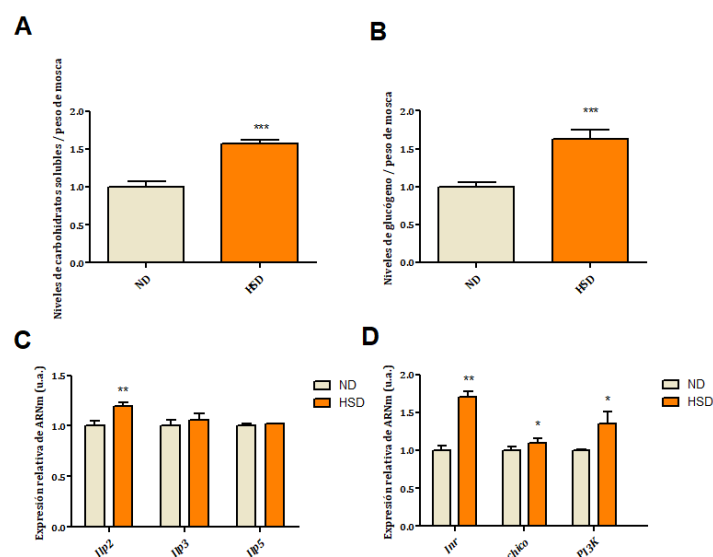


Figura 29. Alteraciones metabólicas en el modelo en *Drosophila* de la DMT2. Los niveles de (A) carbohidratos solubles y (B) glucógeno se midieron utilizando el reactivo antrona en moscas *y,w* de 15 días de edad cultivadas en medio control (ND) o en medio alto en azúcar (HSD). (C-D) Niveles de

expresión de los genes *Ilp2*, *Ilp3* y *Ilp5*, y de genes de la RSI en moscas de 15 días de edad, analizados mediante RT-qPCR. En todos los casos los resultados se referencian a los valores obtenidos en moscas cultivadas en ND. Las barras de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas en A y B, y de 4 experimentos independientes en C y D (*, p-valor<0.05; **, p-valor<0.01; ***, p-valor<0.001).

4.2.3. Estudio de la relación entre moscas modelo de la enfermedad de Parkinson y de la Diabetes Mellitus tipo 2

Como hemos comentado previamente, se han publicado varios estudios apuntando hacia la existencia de una relación entre la EP y la DMT2 (Fiory et al., 2019; Sharma et al., 2021). De hecho, ambas enfermedades comparten algunos fenotipos, siendo uno de los más estudiados la presencia de alteraciones mitocondriales (Hassan et al., 2020). Para comprobar la relación existente entre ambas enfermedades, nos propusimos estudiar si las moscas modelo de la DMT2 presentaban algunas de las alteraciones presentes en las moscas mutantes *DJ-1 β* . Las mitocondrias son el principal orgánulo responsable de la producción de ROS, y su alteración conduce a un aumento en los niveles de EO (Kudryavtseva et al., 2016). Por ello, decidimos estudiar si las moscas modelo de la DMT2 presentaban alteraciones similares. Nuestros resultados mostraron que las moscas de 15 días de edad cultivadas en HSD presentaban un aumento en los niveles de carbonilación de proteínas (un marcador de los niveles de EO) en comparación a las moscas cultivadas en ND (Fig. 30A). Además, se ha demostrado recientemente que las alteraciones mitocondriales en modelos de la EP basados en la mutación del gen *DJ-1* producen una reducción de los niveles de ATP (Sanz et al., 2021; Solana-Manrique et al., 2022), lo que conduce a un aumento de la ruta glucolítica con el objetivo de contrarrestar dichos niveles (Requejo-Aguilar et al., 2015). De acuerdo con lo encontrado en mutantes *DJ-1 β* , nuestros resultados confirman que las moscas modelo de la DMT2 de 15 días de edad también presentan una reducción de los niveles de ATP (Fig. 30B), probablemente debido a la presencia de alteraciones mitocondriales. Además, también encontramos que estas moscas tienen aumentada la actividad de Hk, Pfk y Pk (Fig. 30C), enzimas clave de la ruta glucolítica, lo que confirma que la actividad de esta ruta está aumentada. Asimismo, descubrimos que las moscas cultivadas en HSD presentan un peso más bajo que las cultivadas en ND (Fig. 30D), lo cual puede deberse a un incremento del gasto energético producido por el aumento de la ruta glucolítica, al igual que se ha sugerido en las moscas mutantes *DJ-1 β* . Esta disminución del peso también se ha encontrado en otros modelos de la DMT2 en invertebrados (Matsumoto et al., 2011; Pasco & Léopold, 2012). En estos estudios encontraron éstos ingerían menos comida; sin embargo, la cantidad de calorías ingeridas era mayor que la de los animales control. Por tanto, se sugirió que la pérdida de peso podría estar causada por alteraciones en los mecanismos implicados en el crecimiento de los tejidos (Matsumoto et al., 2011; Pasco & Léopold, 2012).

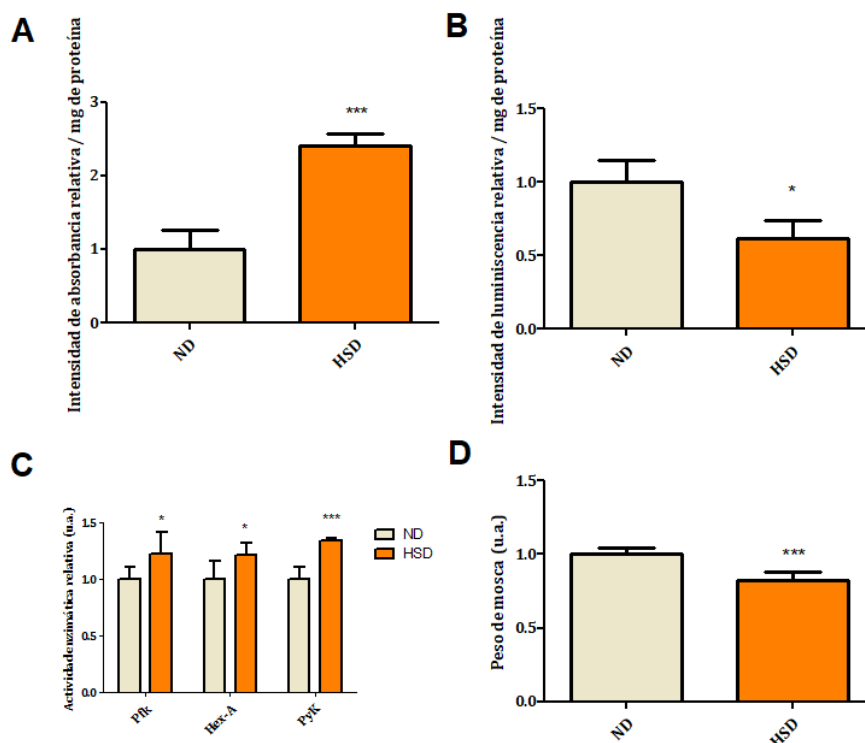


Figura 30. Análisis fenotípicos en las moscas modelo de la DMT2. (A) Los niveles de carbonilación de proteínas se midieron usando el compuesto DNPH en moscas de 15 días de edad. Los resultados se muestran como intensidad de absorbancia relativa / mg de proteína en moscas cultivadas en HSD, referenciándose al valor obtenido en las moscas cultivadas con la ND. (B) Los niveles de ATP se midieron usando el kit *ATP Determination KIT* (Invitrogen) en moscas de 15 días de edad. Los resultados se muestran como intensidad de luminiscencia relativa / mg de proteína, en moscas cultivadas en HSD referenciándose al valor obtenido en las moscas cultivadas en ND. (C) La actividad de las enzimas hexoquinasa (Hex-A), fosfofructoquinasa (Pfk) y piruvato quinasa (PyK) se midió mediante reacciones acopladas en moscas de 15 días de edad. Los resultados se muestran como actividad enzimática relativa, referenciándose al valor de las moscas cultivadas con la ND. (D) Peso de moscas de 15 días de edad. Los resultados están referenciados al valor obtenido en las moscas cultivadas con la dieta control (ND). Las barras de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas en A, B y C, y de al menos 6 experimentos independientes en D (*, p-valor<0.05; ***, p-valor<0.001).

Por otro lado, la DMT2 se considera un factor de riesgo para desarrollar la EP (Hassan et al., 2020). Con el objetivo de comprobar esta afirmación en *Drosophila*, decidimos estudiar si las moscas modelo de la DMT2 presentaban alguno de los fenotipos más característicos de las moscas modelo de la EP. Entre ellos, se ha descrito que las moscas mutantes *DJ-1β* presentan alteraciones motoras y una reducción de la esperanza de vida (Lavara-Culebras et al., 2010; Lavara-Culebras & Paricio, 2007). Nuestros resultados mostraron que las moscas cultivadas en HSD presentan una reducción en la esperanza de vida en comparación con las cultivadas en ND (Fig. 31A). Además, estas moscas también presentaron defectos locomotores a partir de los 28 días de edad (Fig. 32B). Se ha demostrado que estas alteraciones motoras aparecen en la EP cuando se produce una pérdida de neuronas DA de aproximadamente un 40-60 % (Mahlknecht et al., 2022). Esta pérdida de neuronas

DA, además, es el rasgo característico principal de la EP (Vázquez-Vélez et al., 2021). Por lo tanto, decidimos estudiar si en las moscas modelo de la DMT2 podría estar ocurriendo degeneración o mal funcionamiento de esas neuronas. Para ello, realizamos un Western blot con el objeto de cuantificar la expresión de la proteína tirosina hidroxilasa (TH), un marcador específico de neuronas DA. Estudios previos han demostrado que los niveles de TH se pueden considerar como un marcador fiable de neuronas DA funcionales (Molina-Mateo et al., 2017). La expresión de TH se analizó en extractos proteicos de cabezas de moscas cultivadas en HSD de 28 días de edad, momento en el que presentaban los defectos locomotores. Nuestros resultados mostraron que dichos niveles eran más bajos en las moscas cultivadas en HSD en comparación con las cultivadas en ND (Fig. 32C), confirmándose así la reducción de neuronas DA funcionales en las moscas modelo de la DMT2 y la relación entre ambas enfermedades.

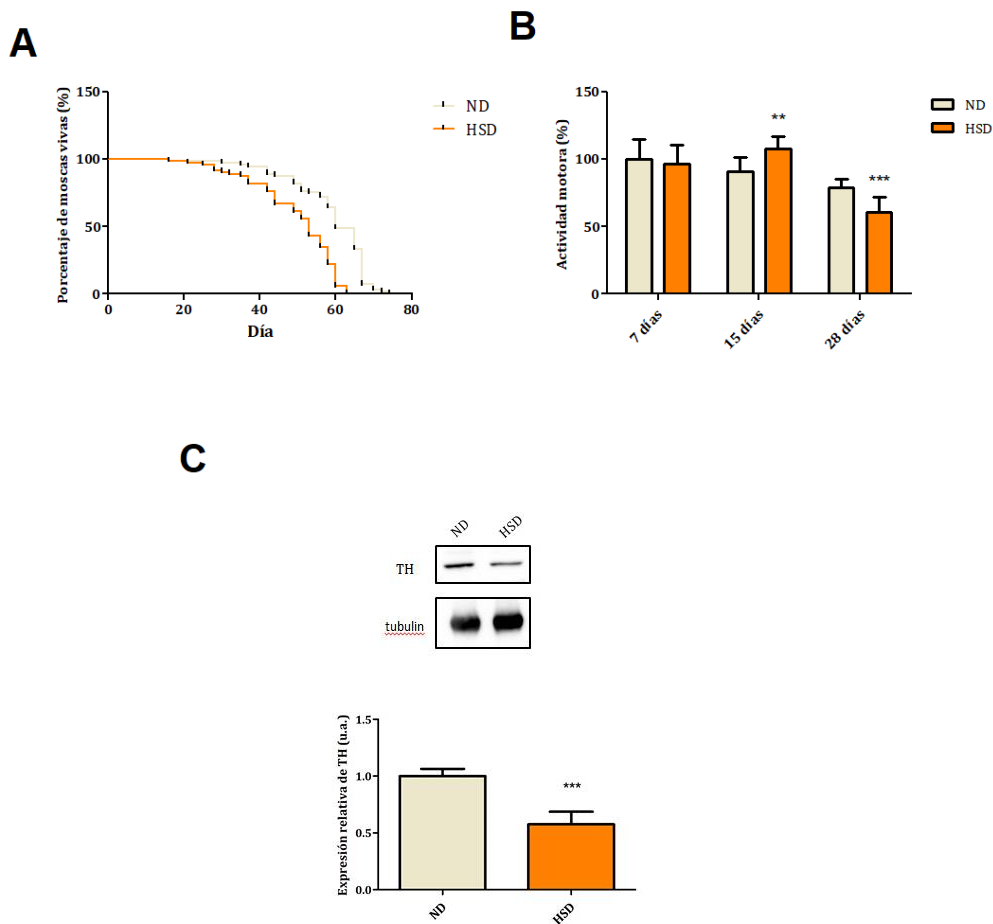


Figura 31. Fenotipos relacionados con la EP en el modelo de DMT2 de *Drosophila*. (A) Curvas de supervivencia de moscas cultivadas en ND y en HSD. El cálculo de la diferencia entre ambas curvas de supervivencia se calculó mediante el test estadístico *Kapla-Meier log-rank* (***, p-valor<0.001). (B) La actividad motora se evaluó mediante la realización de un ensayo de escalada. Los resultados se referenciaron al valor obtenido en las moscas de 7 días de edad cultivadas en ND. (C) La expresión de la proteína TH se midió en cabezas de moscas de 28 días de edad cultivadas en HSD y en ND. Se utilizó el valor de la proteína tubulina como control de carga. El panel superior muestra una imagen representativa de un western blot, mientras que la gráfica muestra la cuantificación de la expresión

de TH referida a la de tubulina. Las barras de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas. (**, p-valor<0.01; ***, p-valor<0.001).

4.2.4. Estudio del efecto de la deficiencia del gen *DJ-1* en moscas cultivadas en una dieta rica en azúcares

Algunos estudios publicados hasta la fecha han demostrado que algunas líneas celulares, como las células humanas PC12, cultivadas con concentraciones elevadas de azúcar presentan un incremento de los niveles de EO (Renaud et al., 2014). Curiosamente, además del ya conocido efecto antioxidante de la proteína DJ-1, se ha demostrado recientemente que ésta también juega un papel importante en el metabolismo (Mencke et al., 2021; Solana-Manrique et al., 2020, 2022). Por lo tanto, es posible que la falta de función de *DJ-1* pueda tener efectos nocivos si los niveles de glucosa son elevados. Con el objetivo de estudiar esta hipótesis, decidimos cultivar las moscas mutantes *DJ-1 β* en HSD durante 15 días. Como era esperable, los resultados mostraron que estas moscas presentaban un aumento de los niveles de carbohidratos solubles y de glucógeno (Fig. 32A, B). Posteriormente, para evaluar si la falta de función de *DJ-1 β* jugaba un papel importante en esta ruta, comparamos el incremento en los niveles de carbohidratos solubles y de glucógeno, tanto en mutantes *DJ-1 β* y en moscas control *y,w* cultivadas en HSD y en ND (HSD/ND). Nuestros resultados reflejaron que dicho aumento era mayor en mutantes *DJ-1 β* que en moscas control en el caso del glucógeno, pero no se observaron diferencias en los valores de carbohidratos solubles (Fig. 32C, D). Esto sugiere que la falta de función de *DJ-1 β* parece jugar un papel importante en la aparición de alteraciones en el metabolismo del glucógeno. Posteriormente, decidimos estudiar si el cultivo de las moscas mutantes *DJ-1 β* en HSD afectaba a su actividad motora, dado que se ha visto que la hiperglucemia aumenta los niveles de EO (Renaud et al., 2014), y los mutantes *DJ-1 β* presentan hipersensibilidad a ese tipo de estrés (Lavara-Culebras & Paricio, 2007; Meulener et al., 2005; Park et al., 2005). De acuerdo con esta hipótesis, encontramos que las moscas mutantes *DJ-1 β* presentaban defectos motores al ser cultivadas en HSD a partir del día 7 de edad (Fig. 32E), mientras que las moscas control desarrollaban los defectos motores a partir del día 28 (Fig. 31B). Por tanto, los resultados obtenidos confirman que los mutantes *DJ-1 β* son más sensibles a un incremento de los niveles de glucosa, y que este gen puede jugar un papel importante en el metabolismo de los carbohidratos.

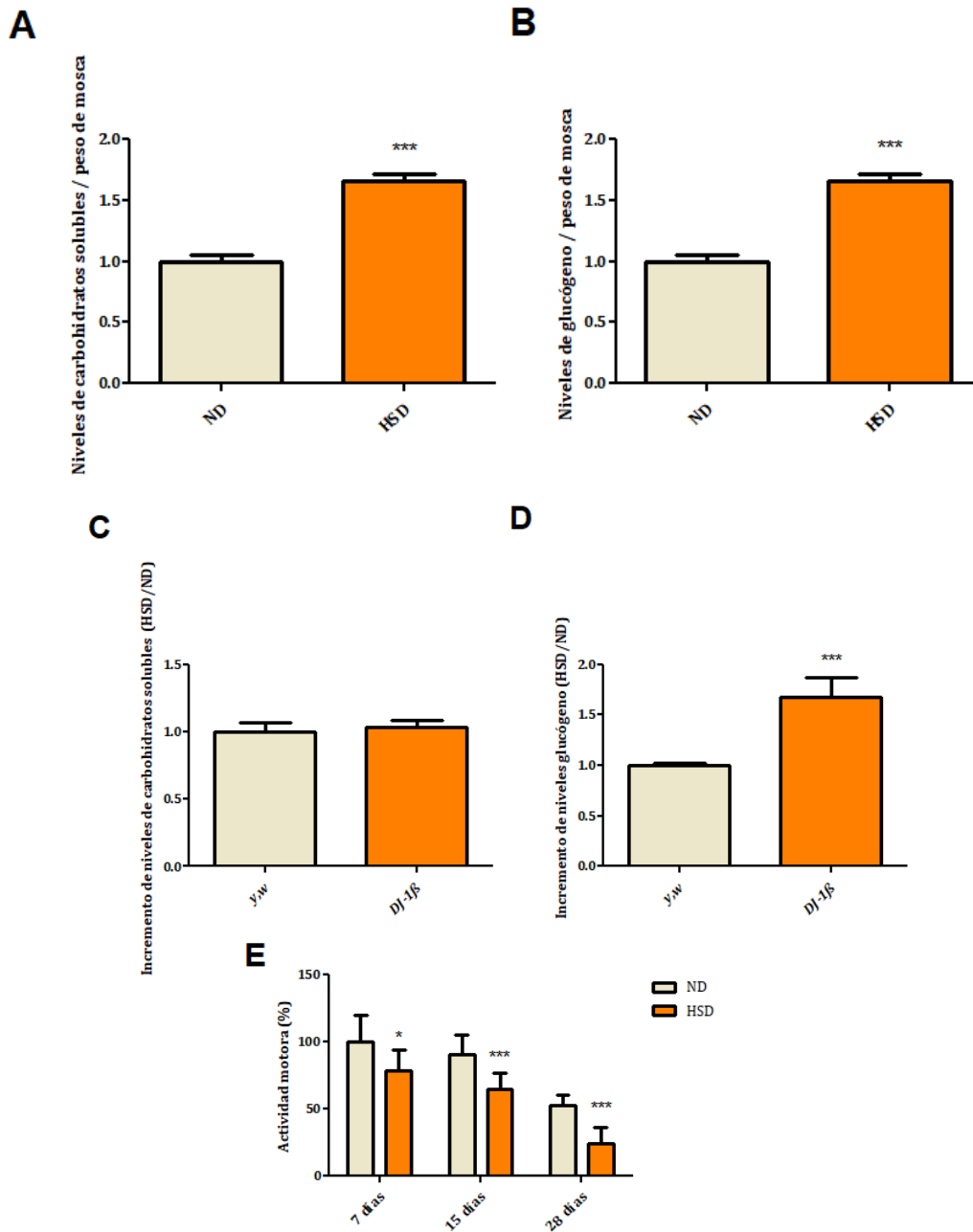


Figura 32. Efecto de la HSD en las moscas modelo de la EP. Los niveles de (A) carbohidratos solubles y (B) glucógeno se midieron utilizando el reactivo antrona en moscas mutantes *DJ-1β* de 15 días de edad cultivadas ND o en HSD. (C-D) Incremento de los niveles de carbohidratos solubles y de glucógeno de moscas *y,w* y *DJ-1β* de 15 días de edad cultivadas en HSD en comparación con las cultivadas en ND. (E) La actividad motora de las moscas mutantes *DJ-1β* de diferentes edades se evaluó mediante la realización de un ensayo de escalada. Los resultados se referencian a los obtenidos en moscas cultivadas en ND. En todos los casos, las barras de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas (*, p-valor<0.05; ***, p-valor<0.001).

4.2.5. Efecto de niveles elevados de glucosa en un modelo de la Diabetes Mellitus tipo 2 en ratón y en células humanas SH-SY5Y

Para confirmar el papel de la DMT2 en el desarrollo de la EP, decidimos utilizar un modelo de esta enfermedad en ratón. Uno de los modelos mejor caracterizados de la DMT2 en este organismo se obtiene al alimentar los ratones con HFD (de *high fat diet*) durante 12 semanas, lo cual produce un incremento de los niveles de glucosa en sangre (Surwit et al., 1988). En primer lugar, analizamos los niveles de TH en cerebros de ratonas de 10 meses de edad alimentadas con HFD y con dieta control (ND, de *normal diet*). Como ocurrió con el modelo de la DMT2 en *Drosophila*, encontramos que las hembras alimentadas con HFD presentaban una reducción de estos niveles en comparación con las alimentadas con ND (Fig. 33). Estos resultados sugieren que estas ratonas podrían presentar una reducción del número de neuronas DA o de su funcionalidad, al igual que ocurre en moscas modelo de la DMT2. Estudios previos llevados a cabo en otros modelos de la DMT2 en ratón han mostrado la existencia de degeneración de neuronas DA, confirmando nuestros resultados (Han et al., 2021; Jain et al., 2012; Renaud et al., 2018).

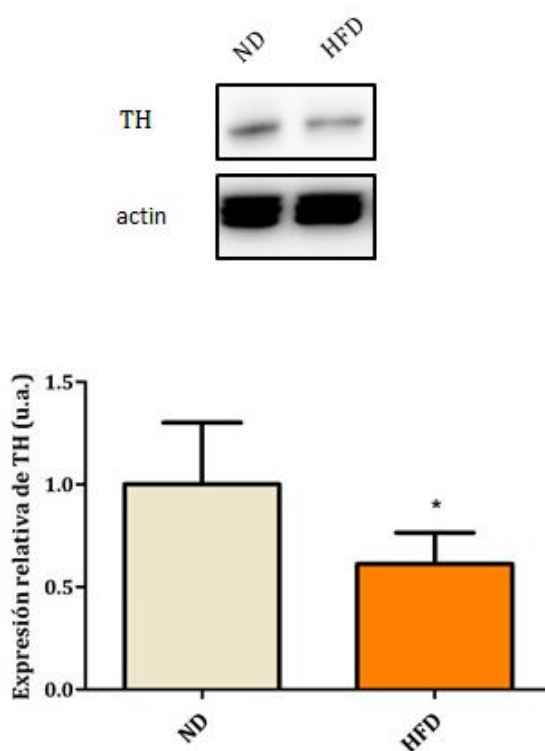


Figura 33. Expresión de TH en un modelo de DMT2 en ratón. La expresión de TH se cuantificó mediante western blot con un anticuerpo anti-TH, y se utilizó el valor de la expresión de actina como control de carga. El panel superior muestra una imagen representativa de un western blot, mientras que la gráfica muestra la cuantificación de la expresión de TH referenciada a la de actina. Las barras de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas. (*, p-valor<0.05).

Hasta la fecha, las causas por las que la DMT2 está favoreciendo el desarrollo de la EP no están claras. Entre ellas, se ha propuesto que podrían jugar un papel

relevante los defectos a nivel vascular, los niveles elevados de metilglioxal y el aumento del EO o de los niveles de glucosa (Hassan et al., 2020; Murillo-Maldonado et al., 2011). Debido a que algunos fármacos utilizados para tratar la diabetes (compuestos que son capaces de reducir los niveles de glucosa en sangre) están siendo considerados como posibles tratamientos para la EP (Labandeira et al., 2022; Renaud et al., 2018), decidimos estudiar si concentraciones elevadas de glucosa podrían ejercer un efecto perjudicial en las células SH-SY5Y. Para ello, cultivamos estas células en medio de cultivo suplementado con concentraciones crecientes de glucosa (50-175 mM) (Cho et al., 2019), y se realizó un ensayo para medir la viabilidad celular en las diferentes condiciones. Nuestros resultados mostraron una reducción de la viabilidad celular a medida que se aumentaba la concentración de glucosa a partir de 100 mM (Fig. 34A), lo que confirma el efecto tóxico de un alto nivel de glucosa en células SH-SY5Y. Posteriormente, para averiguar el mecanismo por el que dicho aumento podría estar produciendo la muerte neuronal, decidimos estudiar su efecto sobre la activación de la proteína proapoptótica JNK (Ambacher et al., 2012; Sanz et al., 2021; Zhang et al., 2019) mediante la realización de un western blot. Los resultados obtenidos mostraron que las células cultivadas con glucosa a una concentración de 125 mM presentaban un aumento de la fosforilación de JNK (Fig. 34B), lo que produce su activación, desencadenándose la muerte celular. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia que tiene la DMT2 en el desarrollo de la EP, causada entre otros factores, por el aumento de los niveles de glucosa.

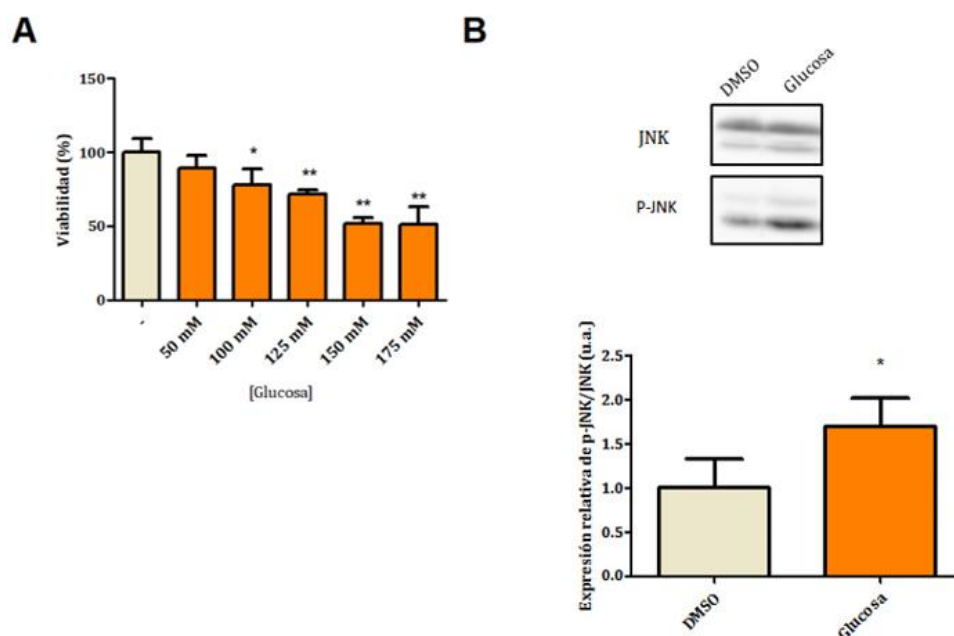


Figura 34. Efecto de la glucosa en células SH-SY5Y humanas. (A) La viabilidad de las células SH-SY5Y se midió mediante un ensayo de MTT a diferentes concentraciones de glucosa. Los resultados están referenciados al valor obtenido en las células cultivadas en medio vehículo (DMSO al 0.1% (-)). (B) La expresión de las proteínas JNK y p-JNK se midió en células cultivadas en medio control (DMSO al 0.1%) o con 125 mM de glucosa. El panel superior muestra una imagen representativa de los

resultados obtenidos en un western blot, mientras que las gráficas muestran la cuantificación de la expresión relativa de la forma fosforilada de JNK con respecto a la de la forma sin fosforilar. Las barras de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas. (*, p-valor<0.05; **, p-valor<0.01).

4.2.6. Efecto de la metformina en células mutantes *DJ-1* y en moscas modelo de la Diabetes Mellitus tipo 2

Dada la importante implicación que la DMT2 parece tener en el desarrollo de la EP, recientemente se ha propuesto la utilización de fármacos antidiabéticos como tratamientos para la EP (Labandeira et al., 2022; Renaud et al., 2018). Curiosamente, en un rastreo piloto realizado por nuestro grupo en moscas mutantes *DJ-1 β* , se identificó la metformina (MET) como uno de los compuestos potencialmente terapéuticos para la EP (Sanz et al., 2017). La MET es un fármaco muy utilizado en el tratamiento de la DM; sin embargo, se ha visto que también presenta un efecto neuroprotector a través de la vía de señalización de la 5'-adenosine mono-phosphate-activated protein kinase (AMPK) (Paudel et al., 2020). Por lo tanto, nos propusimos investigar si este compuesto podría ser un buen candidato para tratar la EP. Primero, decidimos confirmar su efecto neuroprotector evaluando su efecto sobre la viabilidad de las células mutantes *DJ-1* tras ser sometidas a EO. Para ello, dichas células fueron pretratadas con diferentes concentraciones del compuesto y se realizó un ensayo de viabilidad con MTT. Los resultados confirmaron que la MET tiene un efecto neuroprotector dependiente de dosis, siendo 50 μ M la concentración más efectiva (Fig. 35).

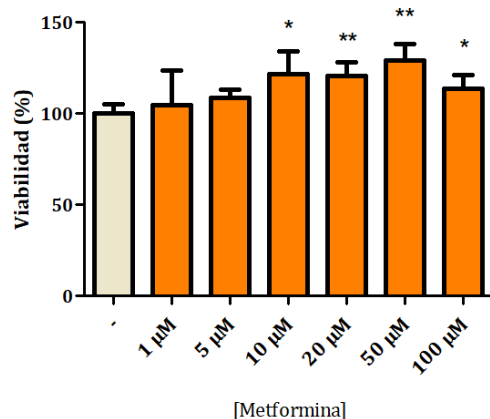


Figura 35. Efecto de la MET en células mutantes *DJ-1*. La viabilidad se midió mediante un ensayo de MTT en las células *DJ-1* tras ser sometidas a EO mediante la adición de H₂O₂ a una concentración final de 100 μ M. Los resultados están referenciados al valor obtenido en las células cultivadas en medio vehículo (DMSO al 0.1% (-)). Las barras de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas. (*, p-valor<0.05; **, p-valor<0.01).

Posteriormente, decidimos estudiar si la MET era capaz de suprimir los fenotipos encontrados en las moscas modelo de la DMT2, tanto relacionados con la DM como

con la EP. En primer lugar, encontramos que las moscas cultivadas en HSD presentaban una reducción de los niveles de carbohidratos y de glucógenos tras el tratamiento con MET (Fig. 36A, B), confirmando así su efecto antidiabético. A continuación, también encontramos que el tratamiento con MET era capaz de reducir los niveles de carbonilación de proteínas (Fig. 36C) y los defectos motores (Fig. 36D). Finalmente, quisimos determinar si este aumento de la actividad motora podría estar asociada a una mejora en la actividad dopaminérgica. Para ello, realizamos un western blot en extractos de cerebros de moscas modelo de la DMT2 con el objeto de cuantificar los niveles de TH, encontrando que las moscas tratadas con MET presentaban niveles elevados de esta proteína (Fig. 36E), confirmándose así su efecto neuroprotector.

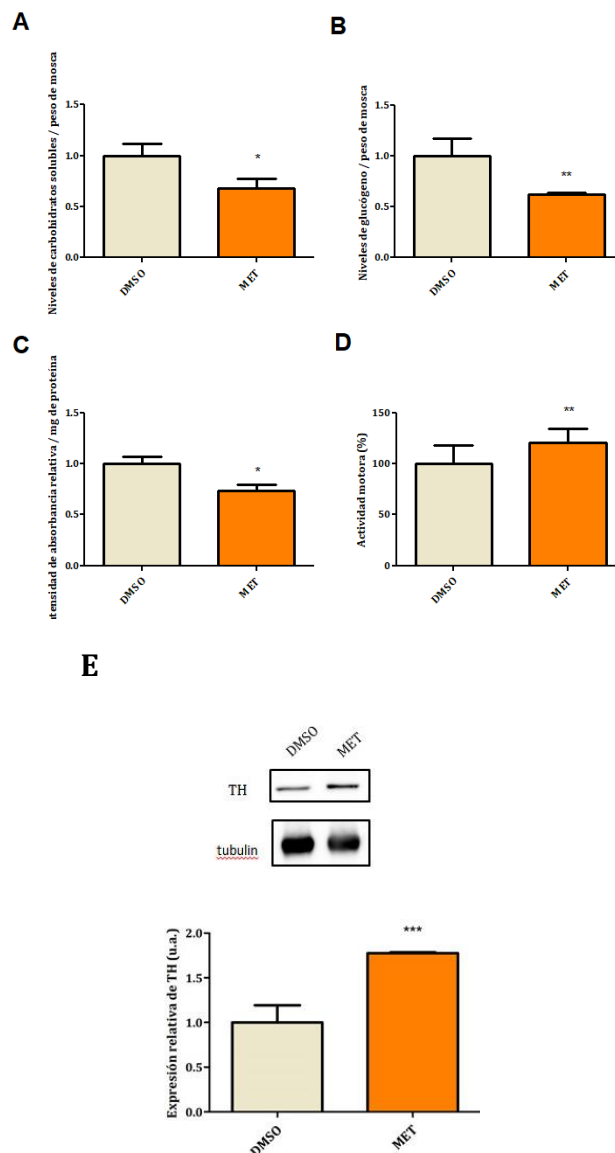


Figura 36. Efecto de la MET en las moscas modelo de la DMT2. Los niveles de (A) carbohidratos solubles y (B) glucógeno se midieron utilizando el reactivo antrona en moscas modelo de la DMT2 de 15 días de edad cultivadas en medio control (DMSO al 0.1%) o en presencia de 25 mM de MET. (C) Los niveles de carbonilación de proteínas se midieron usando el compuesto DNPH en moscas de 15 días de edad. Los resultados se muestran como intensidad de absorbanza relativa / mg de proteína.

(D) La actividad motora de las moscas modelo de la DMT2 se evaluó mediante la realización de un ensayo de escalada. (E) La expresión de la proteína TH se midió en cabezas de moscas de 28 días de edad. Se utilizó el valor de tubulin como control de carga. El panel superior muestra una imagen representativa de los resultados de un western blot, mientras que la gráfica muestra la cuantificación de la expresión de TH referenciada a la de tubulina. En todos los casos los resultados están referenciados a los valores obtenidos en las moscas modelo de la DMT2 sin tratar (DMSO al 0.1%). Las barras de error muestran la s.d. de tres experimentos independientes en los que se usaron tres réplicas biológicas distintas. (*, p-valor<0.05; **, p-valor<0.01; ***, p-valor<0.001).

DISCUSIÓN

5.1. Uso de *Drosophila* para la identificación de compuestos candidatos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson

La búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que sean efectivas para la EP se ha convertido en un gran reto para la sociedad, debido a que es una enfermedad incurable, y a que se espera un importante aumento a nivel mundial del número de personas que la padecerán en un futuro próximo (Fletcher et al., 2021; Vacca, 2019). En este escenario, nos planteamos la realización de un RGE usando un modelo de la EP en *Drosophila* para evaluar el efecto de un enorme número de compuestos sobre los síntomas motores. Cabe destacar que este es el primer RGE realizado en moscas modelo de la EP en el que se evalúa el efecto de múltiples compuestos sobre la actividad motora. En este estudio, hemos utilizado los 1120 compuestos incluidos en la quimioteca Prestwick®, que son de muy diversa naturaleza y presentan diferentes mecanismos de acción. La mayoría de estos compuestos están aprobados por alguna agencia reguladora (como la *European Medicines Agency* (EMA) o la FDA), por lo que ya han sido evaluados en humanos, y hay datos disponibles sobre su seguridad y su biodisponibilidad. Por lo tanto, algunos de los compuestos identificados en el RGE podrían ser susceptibles de reposicionamiento lo que, como hemos comentado previamente, permite asignar nuevas indicaciones terapéuticas para compuestos ya comercializados y, por tanto, acelerar su uso en pacientes con EP (Gasparini & di Paolo, 2019). La realización del RGE nos permitió identificar 10 compuestos que mejoraron la actividad motora de las moscas mutantes *DJ-1β* y que, además, incrementaron la viabilidad de células mutantes *DJ-1* tras ser sometidas a EO. Curiosamente, dos de los compuestos identificados fueron la bumetanida y la clonidina, que se encuentran actualmente en ensayos clínicos para evaluar su eficacia como posibles tratamientos para la EP (McFarthing et al., 2021). Este resultado refuerza la idoneidad del RGE y confirma que los compuestos identificados podrían ser buenos candidatos para tratar la EP. Debido a que el RGE solo ofrece resultados preliminares sobre la efectividad de los compuestos, la realización de ensayos adicionales es completamente necesaria para poder confirmar su potencial terapéutico, y comprobar mediante qué mecanismos de acción podrían estar ejerciendo su efecto beneficioso. A continuación, se procederá a discutir los resultados obtenidos con algunos de los compuestos identificados.

5.1.1. El zaprinast, un inhibidor de PDE y agonista del receptor GPR35, es un potencial tratamiento para la enfermedad de Parkinson

De los diez compuestos identificados en el RGE, el ZAP fue el más eficaz en aumentar la viabilidad del modelo celular de la EP. El ZAP es un inhibidor de las PDE 1, 5, 6, 9 y 11, y también un agonista del receptor GPR35 (Medina, 2011; Taniguchi et al., 2006). Por tanto, todas esas proteínas podrían ser consideradas como dianas terapéuticas para la EP. Estudios previos han confirmado que tanto la PDE1 como el receptor GPR35 se expresan en el mesencéfalo (Nthenge-Ngumbau & Mohanakumar, 2018; *The Human Protein Atlas*). Hay que destacar que los inhibidores de PDE han sido ampliamente estudiados y propuestos como posibles

tratamientos para la EP, incluso algunos de ellos han sido probados en ensayos clínicos y patentados (Nthenge-Ngumbau & Mohanakumar, 2018). Estos compuestos actúan inhibiendo la degradación del cAMP y/o cGMP, nucleótidos cíclicos que están relacionados con muchas funciones a nivel del SNC (Kelly, 2018; Nthenge-Ngumbau & Mohanakumar, 2018). De hecho, se ha demostrado que las alteraciones en los niveles de estos nucleótidos cíclicos pueden desencadenar el desarrollo de enfermedades relacionadas con el envejecimiento, entre ellas la EP (Kelly, 2018; Nthenge-Ngumbau & Mohanakumar, 2018; Peixoto et al., 2015). Tanto el cAMP como el cGMP pueden activar la ruta apoptótica mediada por las vías de señalización Akt y JNK (Nthenge-Ngumbau & Mohanakumar, 2018; Peixoto et al., 2015; Zhang et al., 2008). En este contexto, nuestros resultados han confirmado que las células mutantes *DJ-1* presentan un incremento de la apoptosis a través de la activación del factor proapoptótico JNK y de la inhibición del factor antiapoptótico Akt, y que el tratamiento con ZAP consigue contrarrestar este efecto, lo que conduce a una mejora en la supervivencia celular. Por tanto, el ZAP podría ejercer su efecto beneficioso mediante la inhibición de las PDE, tanto en el modelo celular de la EP como en las moscas modelo, en las que esas enzimas tienen un papel similar a los de humanos.

Por otro lado, como ya se ha mencionado, el ZAP también podría actuar como un agonista del receptor GPR35 en el modelo celular, dado que no hay ortólogos de esta proteína en *Drosophila*. Hasta la fecha, se han realizado muy pocos estudios sobre este receptor y se desconoce su relación con la EP. Algunos de esos estudios han sugerido que el receptor GPR35 puede jugar un papel importante en la excitabilidad neuronal y en la liberación sináptica (Mackenzie & Milligan, 2017; Reggio & Shore, 2015), así como controlar el proceso de inflamación y el sistema inmune (Divorty et al., 2015; Quon et al., 2020). Por otro lado, se ha demostrado que el ZAP es capaz de inhibir a los canales de Ca²⁺ tipo N mediante la activación del receptor GPR35 (Guo et al., 2008). Es interesante mencionar que estos canales están sobreexpresados y sobreactivados en un modelo en ratón de la EP basado en la sobreexpresión de α -syn, lo que puede conducir al desarrollo de degeneración axonal (Sgobio et al., 2019). Estos resultados, junto con la identificación del ZAP en el RGE, nos hacen pensar que la activación del receptor GPR35 podría suponer una estrategia prometedora para el tratamiento de la EP. Apoyando esta hipótesis, hemos demostrado que el pretratamiento de las células con CID2745687, un inhibidor del receptor GPR35, consigue atenuar el efecto neuroprotector del ZAP. Este resultado sugiere que el ZAP debe estar ejerciendo dicho efecto, al menos en parte, a través de la activación del receptor GPR35. Además, nuestros resultados han mostrado que la administración de KYN, el precursor del ácido quinurenínico que es considerado como el ligando endógeno del receptor GPR35 (Cosi et al., 2011), produce un ligero efecto neuroprotector sobre nuestro modelo celular de la EP. La KYN forma parte de una ruta metabólica que ha sido relacionada previamente con la EP. De hecho, se ha visto que algunos pacientes con la enfermedad que sufren LID presentan niveles reducidos de ácido quinurenínico (Havelund et al., 2017).

Estudios previos han visto que el ácido quinurenínico ejerce un efecto neuroprotector, mientras que sus metabolitos presentan neurotoxicidad (Venkatesan et al., 2020). Por lo tanto, la ruta de la KYN, estrechamente ligada con la activación del receptor GPR35, también podría suponer una diana terapéutica para el tratamiento de la EP. De acuerdo con esta suposición, se ha encontrado que la inhibición de enzimas relacionadas con la degradación del ácido quinurenínico es capaz de reducir la neurodegeneración en modelos de la EP en *Drosophila* (Breda et al., 2016).

Posteriormente, estudiamos si el ZAP era capaz de ejercer un efecto beneficioso a través de otros mecanismos de acción que pudieran ser relevantes en la EP. Las alteraciones metabólicas y los niveles elevados de EO juegan un papel importante en el desarrollo de la EP, así como de otras EN (Grünwald et al., 2019; Pozo Devoto & Falzone, 2017). Estas alteraciones están íntimamente ligadas con el metabolismo energético, el cual está alterado en la EP (Anandhan et al., 2017; Bolaños et al., 2009). Más en concreto, las alteraciones mitocondriales provocan un aumento de los niveles de EO y una reducción de los niveles de ATP (Requejo-Aguilar & Bolaños, 2016). Se ha propuesto que dicha reducción parece ser compensada mediante un incremento de la tasa glucolítica (Requejo-Aguilar & Bolaños, 2016; Solana-Manrique et al., 2020, 2022). Por tanto, la activación farmacológica de la ruta glucolítica podría ser una buena estrategia terapéutica para el tratamiento de la EP (Cai et al., 2019; Solana-Manrique et al., 2020). En este trabajo hemos demostrado que las células *DJ-1* presentan una reducción de la viabilidad mitocondrial, lo que podría ir acompañado de un aumento de los niveles de ROS y una reducción de los niveles energéticos (Giachin et al., 2016; Solana-Manrique et al., 2022). Además, hemos encontrado que el tratamiento con ZAP consigue mejorar la viabilidad mitocondrial en el modelo celular de la EP, así como aumentar la actividad glucolítica, lo que conduce a un aumento de los niveles de ATP. Por lo tanto, los resultados obtenidos confirman que el ZAP ejerce un efecto beneficioso en los modelos celular y de *Drosophila* de la EP mediante diferentes mecanismos de acción, y que consigue suprimir diversos fenotipos relacionados con la enfermedad.

5.1.2. La vincamina, un compuesto natural, ejerce un efecto beneficioso en modelos de la enfermedad de Parkinson

La VIN es un alcaloide natural con actividad inhibidora de la PDE1, bloqueante de los CNDV y de los canales de Ca²⁺ tipo L, y un agonista del receptor GPR40 (Abdel-Salam et al., 2016; Du et al., 2019; Sheref et al., 2021). Como se ha comentado previamente, los inhibidores de PDE han sido previamente propuestos como candidatos para tratar la EP (Nthenge-Ngumbau & Mohanakumar, 2018). Más en concreto, se ha descrito que los inhibidores de PDE1 regulan la expresión de factores neurotróficos y de genes implicados en la plasticidad neuronal, la cual se encuentra afectada en la EP (Medina, 2011). Además, se ha visto que la expresión de la PDE1b está incrementada en un modelo de la EP en rata (Sancesario et al., 2004).

Existen pocos estudios sobre la utilización de la VIN como posible tratamiento para EN. Recientemente, se ha evaluado su eficacia en un modelo de la EP en rata, encontrándose que era capaz de mejorar los síntomas motores, además de reducir los niveles de EO y presentar un efecto antiinflamatorio (Sheref et al., 2021). Este compuesto se utiliza actualmente para tratar los problemas de memoria y las alteraciones cognitivas en personas envejecidas o en pacientes con EA, dado que provoca un aumento del flujo sanguíneo cerebral y de la absorción de glucosa (Abdel-Salam et al., 2016). Además, también se ha descrito que la VIN podría ejercer un efecto beneficioso en personas mayores, ya que es capaz de reducir los niveles de Fe en el cerebro, lo que a su vez reduce los niveles de ROS (Han et al., 2017). De acuerdo con esto, nuestros resultados han mostrado que el tratamiento con VIN es capaz de reducir los niveles de ROS y de carbonilación de proteínas en las moscas mutantes *DJ-1 β* , y de reducir los niveles de ROS en las células deficientes en *DJ-1*. Por otro lado, un estudio previo demostró que el aumento de los niveles de AMPc, producido por la acción de los inhibidores de las PDE, puede ejercer un efecto neuroprotector reduciendo la fosforilación, y consiguiente la activación del factor proapoptótico JNK (Zhang et al., 2008). Del mismo modo, nuestros resultados han confirmado que las células deficientes en el gen *DJ-1* tratadas con VIN presentan un aumento de la viabilidad, acompañada de una reducción en la fosforilación de JNK, previniéndose así la apoptosis. Por otra parte, también se ha descrito que la activación de JNK puede conducir a la aparición de alteraciones mitocondriales (Heslop et al., 2020). De hecho, varios grupos han demostrado que las células mutantes *DJ-1* presentan alteraciones en estos orgánulos tanto morfológicas como funcionales (Avazzadeh et al., 2021). Por lo tanto, decidimos estudiar si la reducción en la fosforilación de JNK producida por la VIN iba acompañada de una mejora de la viabilidad mitocondrial. De acuerdo con resultados previos obtenidos por nuestro grupo, confirmamos que las células mutantes *DJ-1* presentaban una reducción de la viabilidad mitocondrial (Sanz et al., 2021). Además, también demostramos que el tratamiento con VIN era capaz de mejorar la viabilidad mitocondrial de estas células.

Como los inhibidores de PDE ya han sido propuestos como tratamientos potenciales para la EP, en este trabajo decidimos enfocarnos en otro de los mecanismos de acción que presenta la VIN. Se ha descrito que la VIN es también un bloqueante de los CNDV, y que estos canales se encuentran alterados en la EP. De hecho, se ha encontrado que están sobreexpresados en modelos animales de la EP (Liu et al., 2021; Wang et al., 2019). En relación con esto, un estudio reciente ha mostrado que el tratamiento con fenitoína, un bloqueante de los CNDV, mejora los defectos motores y cognitivos en un modelo de ratón de la EP (Liu et al., 2021). Estos datos confirman que la sobreactivación de estos canales puede jugar un papel relevante en el desarrollo de la EP; por lo tanto, la inhibición farmacológica de los mismos puede suponer una estrategia terapéutica para tratar la enfermedad. Confirmando esta hipótesis, hemos encontrado que el pretratamiento con un activador de estos canales, la veratradina, reduce el efecto neuroprotector de la VIN.

Este resultado sugiere que la VIN ejerce dicho efecto, al menos parcialmente, mediante el bloqueo de los CNDV.

A pesar de que la VIN ha sido muy poco estudiada como posible tratamiento para la EP (Sheref et al., 2021), hemos podido encontrar algunos trabajos en los que se utiliza la vinpocetina, un derivado semisintético de la VIN (Ali et al., 2022). Se ha descrito que la vinpocetina presenta mecanismos de acción muy similares a la VIN, siendo un inhibidor de la PDE1, y un bloqueante de los CNVD y de los canales de Ca^{2+} tipo L (Ali et al., 2022). Del mismo modo, también se ha demostrado que este compuesto es capaz de aumentar el flujo sanguíneo cerebral, mejorando así la absorción de glucosa y de O_2 a nivel neuronal, lo que conduce a un aumento en los niveles de ATP (Jeon et al., 2010). La vinpocetina es un compuesto con actividad antiinflamatoria; de hecho, se ha visto que pacientes con EP tratados con vinpocetina presentan una reducción de citoquinas proinflamatorias (el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP1)) y un aumento de citoquinas antiinflamatorias (la IL-10 y la IL-8) (Ping et al., 2019). Además, también se ha encontrado que la vinpocetina es capaz de reducir los defectos motores, las alteraciones cognitivas y los niveles de EO, así como aumentar los niveles de dopamina y prevenir la neurodegeneración DA en modelos de la EP en rata y ratón (Ishola et al., 2018; Zaitone et al., 2012). Por lo tanto, los resultados obtenidos en nuestro trabajo, junto con los obtenidos por otros grupos utilizando tanto la VIN como la vinpocetina, sugieren que la VIN podría ser un excelente candidato para tratar la EP. Cabe remarcar que la VIN es un fármaco que ya se encuentra comercializado (Anacervix®) para tratar el deterioro cognitivo leve asociado a la edad. Por lo tanto, se podría realizar el reposicionamiento de este fármaco para tratar la EP.

5.1.3. Otros compuestos candidatos para tratar la enfermedad de Parkinson identificados en el RGE

El RGE nos ha permitido identificar 10 potenciales candidatos para tratar la EP. Dos de ellos, la bumetanida y la clonidina, ya se encuentran en ensayos clínicos en Fase II en pacientes con la EP (NCT03552068 y NCT03899324, respectivamente). Por otro lado, también identificamos la meclizina, un compuesto propuesto previamente como candidato para tratar la EP debido a su mecanismo de acción, basado en el aumento de la tasa glucolítica (Solana-Manrique et al., 2020). El ZAP ha sido ya estudiado y propuesto por nuestro grupo como un potencial tratamiento para la EP (Sanz et al., 2021), y actualmente estamos validando si la VIN podría ser otro compuesto potencialmente terapéutico para esta enfermedad. Por lo tanto, aun nos quedan cinco compuestos adicionales que estudiar: el ácido retinoico, la fentolamina, la rolitetraciclina, la sulfasalazina y la flumetasona.

Entre estos cinco compuestos, hemos empezado a abordar el estudio de dos de ellos: el AR y la FEN. Hasta el momento, solo se han realizado experimentos preliminares para comprobar si tendrían potencial terapéutico para tratar la EP. De hecho, hemos comprobado su eficacia en otro modelo de EPf en *Drosophila* basado

en la mutación del gen *park*, encontrando que ambos compuestos son capaces de mejorar la actividad motora de estas moscas. Además, también hemos comprobado que son capaces de aumentar la viabilidad en las células deficientes para el gen *DJ-1*, e identificado la concentración más eficaz de estos compuestos para la realización de futuros experimentos. El AR es un compuesto derivado de la vitamina A que ya ha sido probado en modelos animales de la EP, encontrándose que es capaz de suprimir algunos de sus fenotipos (Esteves et al., 2015; Yin et al., 2012), lo que convierte al AR en un buen candidato para ser estudiado en más profundidad. Se ha descrito que este compuesto puede ejercer un efecto beneficioso mediante el incremento de la expresión de *Nurr1* y *Pitx3*, dos factores de transcripción clave en el mantenimiento de la homeostasis de las neuronas DA (Esteves et al., 2015). Además, el AR también presenta actividad antioxidante (Siddikuzzaman & Grace, 2013; Yin et al., 2012). Por otra parte, la FEN es un compuesto que actúa como bloqueante no selectivo de los receptores α -adrenérgicos, compuestos que no han sido previamente propuestos para el tratamiento de la EP (Li et al., 2022), por lo que supondrían una nueva estrategia terapéutica para la enfermedad. Es cierto que un estudio recientemente publicado mostró que algunos antagonistas del receptor α 1-adrenérgico, como la terazosina, eran capaces de mejorar varios fenotipos en modelos de la EP en células humanas, en ratón y en *Drosophila* (Cai et al., 2019). Sin embargo, este efecto beneficioso se produjo a través de la activación de la fosfoglicerato quinasa 1 (PGK1), lo que conduce a un aumento de la glucólisis, y de los niveles de ATP. También demostraron que solo aquellos antagonistas del receptor α 1-adrenérgico con un motivo quinazolina en su estructura eran capaces de activar dicha enzima (Cai et al., 2019). Dado que la FEN no presenta dicho motivo, su mecanismo de acción no estaría basado en el aumento de la glucólisis. De hecho, para comprobar esta hipótesis decidimos medir la actividad de las enzimas clave de la glucólisis en las células *DJ-1* tratadas con FEN, encontrando que no había diferencias en sus actividades en comparación con células no tratadas (datos no mostrados). Por lo tanto, será necesaria la realización de nuevos experimentos para descubrir si la FEN está ejerciendo un efecto beneficioso en nuestros modelos de la EP a través del bloqueo no selectivo de los receptores α -adrenérgicos o de otros modos de acción.

La rolitetraciclina es un derivado semisintético de la familia de las tetraciclinas, compuestos con actividad antibiótica de amplio espectro (Chopra & Roberts, 2001; Markulin et al., 2022). Algunos compuestos similares han sido propuestos como candidatos para tratar la EP (Bortolanza et al., 2018; Markulin et al., 2022). Entre ellos, los más estudiados han sido la minociclina y la doxicilina (Bortolanza et al., 2018). Curiosamente, en un rastreo piloto realizado en nuestro grupo encontramos que la minociclina era capaz de suprimir los defectos motores de moscas mutantes *DJ-1 β* y de aumentar la viabilidad de las células *DJ-1* (Sanz et al., 2017). Entre sus mecanismos de acción, se ha descrito que estos dos compuestos presentan actividad antioxidante, siendo capaces de actuar como *scavengers* de radicales libres, además de reducir los niveles de ROS mediante la inhibición de la

óxido nítrico sintasa (Bortolanza et al., 2018). Por otro lado, también se ha demostrado que tienen actividad antiinflamatoria mediante la inhibición de la sobreactivación de la microglía (Lazzarini et al., 2013). Tanto la minociclina como la doxiciclina han sido estudiados en modelos animales de la EP, encontrándose que son capaces de reducir la pérdida de neuronas DA en modelos de ratón (Du et al., 2001; Lazzarini et al., 2013). Por lo tanto, la rolitetraciclina podría ser otro buen candidato para tratar la EP ya que podría presentar estos mismos mecanismos de acción.

Finalmente, otros compuestos candidatos identificados en el RGE son la sulfasalacina y la flumetasona, los cuales presentan actividad antiinflamatoria. La sulfasalacina es un compuesto formado por la sulfapiridina, un antibiótico de la familia de las sulfamidas, y el ácido 5-aminosalicílico, con actividad antiinflamatoria (Plosker & Croom, 2005). La sulfasalacina se utiliza actualmente para tratar la artritis reumatoide, y es capaz de reducir los niveles de citoquinas proinflamatorias en modelos animales de enfermedades autoinmunes (Plosker & Croom, 2005). La flumetasona es un glucocorticoide con actividad antiinflamatoria usado en trastornos de la piel (Sayed et al., 2021). Además, los corticoesteroides se caracterizan por su actividad inmunosupresora (Coutinho & Chapman, 2011). Actualmente, se piensa que el aumento de los procesos inflamatorios que caracterizan a la EP podría deberse a alteraciones del sistema inmune (Herrero et al., 2015). Por lo tanto, el uso de compuestos que presenten actividad moduladora del sistema inmune podrían ser candidatos para tratar esta enfermedad (Herrero et al., 2015). De hecho, un estudio realizado en personas con una edad entre 60-90 años tratadas con corticoesteroides muestra que éstas presentan una incidencia reducida de EP (Racette et al., 2018).

En resumen, todos los compuestos identificados en el RGE pueden ser considerados como compuestos potencialmente terapéuticos para la EP, ya sea porque presentan mecanismos de acción relacionados con la patología de la enfermedad, porque actúan sobre dianas terapéuticas novedosas para tratar la enfermedad, o porque tanto ellos como compuestos similares han sido previamente analizados en modelos preclínicos de la EP. Sin embargo, serán necesarios estudios adicionales para confirmar la eficacia de todos estos compuestos.

5.1.4. Estrategias alternativas para la identificación de nuevos candidatos para tratar la enfermedad de Parkinson

A la hora de diseñar el RGE, se decidió que la línea celular SH-SY5Y era la más adecuada para validar los compuestos capaces de suprimir los defectos motores de las moscas mutantes *DJ-1 β* . Como se ha comentado previamente, estas células son las más utilizadas para el estudio de la EP debido a sus múltiples ventajas (ver apartado 1.8.1). Sin embargo, hay que tener en cuenta que los modelos celulares no presentan todas las posibles dianas terapéuticas presentes en un organismo completo, lo que supone una desventaja importante (Aldewachi et al., 2021). En el caso de la EP este problema se agrava aún más, teniendo en cuenta que es una

enfermedad multifactorial, en la que están afectadas un gran número de estructuras (Poewe et al., 2017). Por lo tanto, es posible que algunos de los compuestos que mejoraron la actividad motora de las moscas modelo no fueran capaces de mejorar la viabilidad de las células SH-SY5Y deficientes en *DJ-1* debido a que estas no expresan las proteínas sobre las que dichos compuestos ejercen su función. Por ejemplo, en un RGE utilizando las células de neuroblastoma humanas SK-N-MC, se demostró que algunos compuestos agonistas de los receptores β 2-adrenérgicos eran capaces de reducir los niveles de α -sinucleína. Sin embargo, estos compuestos no tuvieron ningún efecto en células humanas de eritroleucemia, ya que, aunque expresan el gen de la α -sinucleína, no expresan los receptores β 2-adrenérgicos. Lo mismo ocurrió en células SH-SY5Y porque, aunque éstas sí expresan los receptores β 2-adrenérgicos, los niveles de expresión de α -sinucleína son muy bajos (Mittal et al., 2017). Otro ejemplo lo encontramos en un trabajo en el que se evaluó la eficacia de la luteolina, un flavonoide natural, en células SH-SY5Y. En este estudio encontraron que la luteolina no afectaba a la viabilidad de las células SH-SY5Y, pero sí era capaz de disminuir la muerte celular cuando se realizaba un co-cultivo con células de la microglía sobreactivadas con lipopolisacárido (Zhu et al., 2014). Las células de la microglía son las células más abundantes del sistema inmune del SNC. En condiciones fisiológicas, juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del SNC. Sin embargo, en condiciones patológicas, estas células liberan factores pro-inflamatorios y ROS que pueden producir neurodegeneración (Ho, 2019). De hecho, se ha encontrado que estas células están sobreactivadas en la SNpc de pacientes con EP (Lecours et al., 2018). Por lo tanto, se considera que aquellos compuestos que eviten la sobreactivación de las células de la microglía podrían ser candidatos para tratar la EP (Subramaniam & Federoff, 2017). Curiosamente, la luteolina es uno de los compuestos identificados en el rastreo primario llevado a cabo en esta tesis doctoral; sin embargo, este compuesto no consiguió mejorar la viabilidad de las células SH-SY5Y en la fase de validación probablemente porque ejerce su efecto beneficioso a través de las células de la microglía. Esto nos hace pensar que una nueva fase de validación utilizando otros modelos celulares, como las células de la microglía u otras células gliales, nos permitiría identificar nuevos compuestos potencialmente terapéuticos para la EP entre aquellos que fueron capaces de reducir los defectos motores de los mutantes *DJ-1 β* . La validación de estos compuestos se llevará a cabo en un futuro en cocultivos de células gliales (de microglía y astrocitos) y células SH-SY5Y deficientes en *DJ-1*.

5.1.5. Posibles mejoras para la búsqueda de nuevos tratamientos para la enfermedad de Parkinson

A pesar de los esfuerzos que se están realizando para encontrar nuevas estrategias terapéuticas, la EP sigue siendo una enfermedad incurable (Elkouzi et al., 2019; Solana-Manrique et al., 2019; Vacca, 2019). Muchos de los compuestos identificados en estudios realizados en modelos preclínicos de la enfermedad siguen fallando cuando se evalúa su eficacia en ensayos clínicos. Hay diferentes factores que pueden

influir en la falta de éxito en esos ensayos como son: el diseño inadecuado de estos ensayos, la gran heterogeneidad de los pacientes incluidos en estos o la falta de cribado en su selección, la falta de un método de diagnóstico que permita la identificación de pacientes en la fase prodrómica de la enfermedad, la ausencia de biomarcadores efectivos para evaluar la eficacia de los compuestos y una pobre interpretación de los resultados finales. Sin embargo, este fracaso no se puede achacar solamente al diseño o desarrollo de los ensayos clínicos. Dado que la fisiopatología de la EP no se conoce de forma completa, algunos de los compuestos potencialmente terapéuticos identificados en modelos preclínicos podrían no ser adecuados (Athauda & Foltynie, 2016; Elkouzi et al., 2019). Para evitar este inconveniente, son completamente necesarias nuevas estrategias dirigidas a mejorar la investigación preclínica y clínica. Actualmente, se propone que para identificar nuevos compuestos terapéuticos eficaces en el tratamiento de ENs es importante que estos puedan actuar a través de varias dianas terapéuticas y que sean capaces de suprimir fenotipos en diferentes modelos de la enfermedad correspondiente (Homberg et al., 2016). De hecho, ya que la EP es una enfermedad multifactorial, muchos estudios están considerando que la búsqueda de nuevos tratamientos debería ir dirigida a tratar diferentes aspectos de la enfermedad (Bloem et al., 2021). Esto se podría conseguir bien utilizando una estrategia terapéutica en la que se combinen diferentes compuestos (multiterapia), y/o mediante el uso de compuestos que actúen a través de diferentes dianas terapéuticas. En este sentido, el objetivo de esta tesis doctoral ha sido identificar compuestos candidatos para el tratamiento de la EP mediante la realización de un RGE y siguiendo las recomendaciones anteriores. En concreto, hemos evaluado el efecto de los compuestos candidatos sobre diferentes fenotipos de la EP presentes en nuestros modelos. Por otro lado, algunos de los compuestos identificados, como el ZAP y la VIN, pueden actuar sobre diferentes dianas terapéuticas. Por último, hay que mencionar que se han utilizado diferentes modelos de la enfermedad, concretamente dos modelos en *Drosophila* (moscas mutantes *DJ-1 β* y *park*) y un modelo celular humano. Es interesante destacar que la proteína DJ-1 está sobreoxidada, y probablemente inactiva, en la SNpc de pacientes con EPe (Ariga et al., 2013). Por tanto, los resultados obtenidos en los modelos de la EP basados en la deficiencia en el gen *DJ-1* podrían ser extrapolables no solo a otros casos de EPf sino también a los casos esporádicos de esta enfermedad, ampliándose así el potencial terapéutico de los compuestos identificados.

Si bien es cierto que los resultados obtenidos en esta tesis han permitido demostrar que los compuestos candidatos podrían ser potencialmente terapéuticos para la EP, será necesario validar estos resultados en otros modelos preclínicos de la EP más cercanos a humanos. Por un lado, habría que evaluar su eficacia *in-vivo*, utilizando modelos de la EP en ratón o en rata en los que se puede estudiar el efecto de los compuestos sobre los síntomas motores y no motores de la enfermedad; además, se pueden realizar ensayos de dosis y estudiar diferentes vías de administración (Blesa & Przedborski, 2014). Por otra parte, se podría evaluar su

eficacia sobre neuronas DA derivadas de iPSCs obtenidas de pacientes con EP, tanto de casos familiares como esporádicos. Además, también se podría evaluar su eficacia en organoides, estructuras tridimensionales formadas a partir de células madre y que permiten simular un órgano completo, como podría ser el mesencéfalo (Marotta et al., 2020; Smits et al., 2019). Estos modelos celulares representan un modelo más parecido al tejido humano, reproduciendo fielmente el fondo genético de los pacientes de la EP de los que se han obtenido dichas células. Por otra parte, también permiten la obtención de una mayor cantidad de muestras y suelen ofrecer resultados más reproducibles (Kim et al., 2020).

5.2. Dos enfermedades crónicas relacionadas: la enfermedad de Parkinson y la Diabetes Mellitus tipo 2

El incremento en la esperanza de vida está conduciendo a un aumento de la prevalencia de enfermedades asociadas al envejecimiento, como pueden ser la EP o la DM (Fiory et al., 2019), lo que causa importantes problemas tanto sociales como económicos (Afentou et al., 2019; Standl et al., 2019). La EP tiene una prevalencia del 1% en la población mayor de 65 años, mientras que prevalencia de la DM es del 9.3% (Gouda et al., 2022; Saeedi et al., 2019). Además, se estima que éstas aumentarán en el futuro (Afentou et al., 2019; Mahmood et al., 2021; Saeedi et al., 2019; Standl et al., 2019). Estudios epidemiológicos realizados recientemente sugieren que puede haber una relación entre ambas enfermedades (Fiory et al., 2019). En concreto, estos apuntan a que la DMT2 puede ser un factor de riesgo de padecer la EP, y que puede empeorar el deterioro cognitivo de los pacientes con esta enfermedad (Hassan et al., 2020). De acuerdo con esto, se ha visto que un aumento de la actividad de la RSI consigue mejorar la actividad motora y las habilidades cognitivas en pacientes con EP, además de ejercer un efecto neuroprotector (Sharma et al., 2021). Por otro lado, apoyando la relación entre ambas enfermedades, se han encontrado complicaciones microvasculares en pacientes crónicos con DMT2, las cuales pueden conducir a alteraciones como nefropatía, retinopatía y neuropatía; siendo esta última una posible causa de neurodegeneración dopaminérgica (Álvarez-Rendón et al., 2018). Sin embargo, también se ha propuesto que la neuropatía producida por la DM podría ser debida a otras complicaciones, como la hiperglucemia (Murillo-Maldonado et al., 2011). En lo que respecta a la relación entre ambas enfermedades, nuestro grupo ha mostrado recientemente que las moscas mutantes *DJ-1 β* presentan niveles elevados de trehalosa, el principal azúcar circulante en la hemolinfa de *Drosophila* (Solana-Manrique et al., 2022; Yasugi et al., 2017). De acuerdo con esto, en esta tesis doctoral hemos demostrado que los mutantes *DJ-1 β* presentan altos niveles de carbohidratos solubles y de glucógeno, y que estas alteraciones también aparecen en un modelo de *Drosophila* de EPe. Por lo tanto, merece la pena considerar que ese aumento de los niveles de carbohidratos podría ejercer un papel importante en el desarrollo de la EP.

En este escenario, y con el objetivo de investigar las consecuencias de la hiperglucemia y su relación con la EP, decidimos usar un modelo de la DMT2 en

Drosophila. Este es un organismo modelo muy útil para estudiar la DMT2 debido a que presenta una RSI muy similar a la de humanos (Teleman et al., 2012). En este trabajo hemos utilizado un modelo de la DMT2 inducido por la dieta, cultivando moscas salvajes en un medio rico en azúcares (HSD). Estudios previos mostraron que estas moscas modelo presentan niveles de glucosa más elevados que las moscas cultivadas en ND, y que además desarrollan resistencia a insulina (Birse et al., 2010; Morris et al., 2012; Teleman et al., 2012). De acuerdo con esto, las moscas modelo de la DMT2 utilizadas en nuestro trabajo presentaban niveles elevados de carbohidratos solubles y de glucógeno. Además, también confirmamos que estas moscas muestran una reducción de la actividad de la RSI y un incremento de la expresión de *Ilp2* que, junto al aumento de los niveles de carbohidratos, son las características principales de la DMT2. Nuestros resultados también mostraron que las moscas modelos de la DMT2 tenían menor tamaño y peso que las cultivadas en la ND. Esta reducción de tamaño también se ha encontrado en otros modelos invertebrados de la DMT2, y podría ser debida a una alteración en los mecanismos implicados en el crecimiento de tejidos (Matsumoto et al., 2011; Pasco & Léopold, 2012). Sin embargo, también podría ser causada por un elevado gasto energético como consecuencia de un cambio en el metabolismo, en el que se utiliza la glucólisis en lugar del CAC (Liesa & Shirihai, 2013; Wu et al., 2017). Nuestros resultados confirmaron esta hipótesis, ya que encontramos que las actividades de enzimas clave de la glucólisis estaban aumentadas en las moscas modelo, lo que se corresponde con un aumento de la tasa glucolítica (Teslaa & Teitell, 2014). Además, también encontramos que dichas moscas modelo presentaban niveles reducidos de ATP. Teniendo en cuenta estos resultados, el descubrimiento de fenotipos comunes en las moscas modelo de la DMT2 y de la EP sugiere claramente que existe una relación entre ambas enfermedades (Solana-Manrique et al., 2020, 2022).

Hasta la fecha, se han realizado muchos estudios con el objetivo de confirmar la relación entre la EP y la DMT2. De hecho, la mayoría de los estudios epidemiológicos concluyen que los pacientes con DMT2 tienen un mayor riesgo de padecer la EP, aunque también existen estudios con resultados contradictorios (Cheong et al., 2020; Fiory et al., 2019). Por otro lado, se ha encontrado que la hiperglucemia aumenta los niveles de EO (Renaud et al., 2014), y de glicación de proteínas, lo que conduce a su agregación (Hassan et al., 2020). Además, se ha demostrado que la insulina juega un papel importante en el SNC, ya que las neuronas usan principalmente la glucosa como sustrato energético (Hong et al., 2020; Renaud et al., 2018), y actúa como un factor que promueve la supervivencia y regula la homeostasis mitocondrial (Fiory et al., 2019). En conjunto, estos resultados apoyan la idea de que la DMT2 sea un factor de riesgo para desarrollar la EP. En este trabajo hemos confirmado que el modelo de la DMT2 en *Drosophila* reproduce algunos de los fenotipos relacionados con la EP, como son la reducción de la esperanza de vida, los defectos locomotores y también la pérdida de neuronas DA (estimada mediante la reducción de los niveles de TH). De hecho, algunos estudios previos llevados a cabo utilizando diferentes modelos de la DMT2 en ratón confirman nuestros

resultados ya que muestran pérdida de neuronas DA, además de defectos motores (Figlewicz et al., 1996; Han et al., 2021; Jang et al., 2017; Renaud et al., 2018). Para explicar la neurodegeneración que ocurre en los modelos de la DMT2, se han propuesto varios mecanismos, como son los defectos vasculares, el incremento de los niveles de metilgloxal, el EO o el aumento de los niveles de glucosa (Hassan et al., 2020; Murillo-Maldonado et al., 2011). En este trabajo, hemos demostrado que la presencia de concentraciones elevadas de glucosa en el medio provoca una reducción de la viabilidad en células SH-SY5Y de neuroblastoma (como se ha mostrado previamente en Cho et al. (2019)), lo que desencadena la activación de la ruta apoptótica a través de la activación de JNK. Por lo tanto, nuestros resultados confirman que los niveles elevados de glucosa reducen la supervivencia celular.

La proteína DJ-1 es multifuncional, destacando principalmente por su actividad antioxidante. Sin embargo, DJ-1 también juega un papel importante tanto en el metabolismo como en la homeostasis mitocondrial (Ariga et al., 2013; Mencke et al., 2021; Solana-Manrique et al., 2022). En mamíferos, la insulina se produce en las células β pancreáticas (Cao et al., 2014), que son hipersensibles al EO ya que expresan niveles reducidos de proteínas con función antioxidante (Jain et al., 2012). Además, el mantenimiento de la integridad estructural y de la función de la mitocondria es esencial para la liberación de insulina bajo el estímulo de la glucosa (Jain et al., 2012). Curiosamente, se ha visto que la proteína DJ-1 está sobreexpresada en condiciones hiperglucémicas, y reducida en los islotes pancreáticos de pacientes con DMT2 (Jain et al., 2012). Por lo tanto, se puede suponer que la proteína DJ-1 podría jugar un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de las células β pancreáticas. En *Drosophila*, la insulina es producida y secretada por neuronas especializadas conocidas como IPC (Álvarez-Rendón et al., 2018). Por lo tanto, sería interesante investigar si estas células presentan características similares a las células β pancreáticas de humanos, y si DJ-1 también juega un papel importante en su homeostasis. Dado que la hiperglucemia puede producir un aumento de los niveles de EO (de Iuliis et al., 2022), las moscas mutantes *DJ-1 β* podrían ser más sensibles a elevados niveles de glucosa. De hecho, se ha visto que los ratones mutantes para el gen *DJ-1* muestran intolerancia a la glucosa y una reducción del área de las células β (Jain et al., 2012). En este trabajo, hemos encontrado que las moscas mutantes *DJ-1 β* cultivadas en HSD presentan niveles elevados de carbohidratos solubles y de glucógeno, así como defectos motores en edades más tempranas que las moscas control. Además, nuestros resultados muestran que el aumento de los niveles de glucógeno en las moscas mutantes *DJ-1 β* cultivadas en HSD es superior que en moscas control, lo que sugiere que la pérdida de la función de *DJ-1* puede afectar al metabolismo del glucógeno. De hecho, se ha visto que la hiperglucemia potencia la expresión de genes involucrados en la síntesis de glucógeno, como el que codifica la glucógeno sintasa, y que los niveles de glucógeno se pueden relacionar con alteraciones en el metabolismo de las células β pancreáticas (Ashcroft et al., 2017).

Como la DMT2 y la EP presentan fenotipos comunes, como las alteraciones mitocondriales, el incremento de los niveles de EO, la neuroinflamación y el estrés del RE (Hassan et al., 2020; Rocha et al., 2021), aquellos compuestos dirigidos a restaurar estas alteraciones podrían ser útiles para tratar ambas enfermedades (Hassan et al., 2020; Labandeira et al., 2022). De hecho, fármacos antidiabéticos como son los agonistas de PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*), los agonistas del receptor GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*) y la MET se han considerado como fármacos prometedores para tratar la EP (Hassan et al., 2020; Labandeira et al., 2022; Sharma et al., 2021). Además, hay varios ensayos clínicos en proceso en los que se está estudiando el reposicionamiento de fármacos antidiabéticos para tratar la EP (Fiory et al., 2019; McFarthing et al., 2021). Apoyando esta hipótesis, se ha encontrado que los pacientes con DMT2 tratados con antidiabéticos presentan una incidencia menor de EP (Fiory et al., 2019). Curiosamente, en un rastreo piloto llevado a cabo por nuestro grupo encontramos que la MET era uno de los compuestos capaces de suprimir los defectos motores de las moscas mutantes *DJ-1 β* (Sanz et al., 2017). Por otro lado, se ha demostrado también que la MET previene la muerte celular en un modelo de la DMT2 en ratón (Lu et al., 2016). En nuestro trabajo, hemos validado la potencialidad de la MET como fármaco para tratar la EP en células mutantes *DJ-1*, ya que hemos demostrado que era capaz de aumentar su viabilidad. Además, la MET también es capaz de suprimir fenotipos asociados con la DMT2 y de la EP en las moscas modelo de la DMT2. En primer lugar, encontramos que el tratamiento con MET era capaz de reducir los niveles de carbohidratos solubles y de glucógeno en moscas modelo de la DMT2 de 15 días de edad, confirmando así su acción antidiabética. Posteriormente, demostramos que la MET era capaz de reducir los niveles de carbonilación de proteínas en las moscas modelo de la DMT2 de 15 días de edad, y de mejorar la actividad motora y reducir la pérdida de neuronas DA en las moscas de 28 días de edad.

En resumen, en este trabajo hemos usado moscas mutantes *DJ-1 β* , y dos modelos bien establecidos de la DMT2 en *Drosophila* y ratón, además de células humanas de la línea SH-SY5Y, para estudiar la relación entre la EP y la DMT2. Nuestros resultados han demostrado que las moscas modelo de ambas enfermedades presentan fenotipos comunes, como alteraciones en los niveles de carbohidratos, disfunción de rutas metabólicas relacionadas con la obtención de energía y un aumento de los niveles de EO. Además, las moscas modelo de la DMT2 desarrollan síntomas relacionados con la EP con la edad, y que esa hiperglucemia puede ser una de las causas que desencadene la alteración y/o la pérdida de neuronas DA tanto en los modelos de mosca como de ratón de la DMT2. Es más, también hemos encontrado que la MET, un fármaco antidiabético, es capaz de atenuar fenotipos relacionados con la EP en las moscas modelo de la DMT2, y de aumentar la viabilidad en el modelo celular de la EP basado en el silenciamiento del gen *DJ-1*, lo que sugiere que puede ser un candidato adecuado para tratar la EP. Teniendo en cuenta todo esto, nuestros resultados apoyan la idea de que hay una conexión entre la DMT2 y la EP, y sugieren que los fármacos antidiabéticos pueden

ser candidatos prometedores para ser utilizados como tratamiento de la EP. Finalmente, nuestro trabajo también confirma que las moscas *DJ-1 β* son más vulnerables a condiciones hiperglucémicas. Por lo tanto, proponemos que la falta de función de *DJ-1* (ya sea por mutación en el gen o por inactivación de la proteína, como ocurre en los casos de EPe) puede ejercer un papel perjudicial en la DMT2, siendo capaz de acelerar el desarrollo de la EP en pacientes con DMT2. Sin embargo, serán necesarios experimentos adicionales para confirmar esta hipótesis.

CONCLUSIONES

1. *Drosophila* es un excelente modelo para identificar compuestos con potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades humanas.
2. Mediante la realización de un RGE usando la Quimioteca Prestwick®, se han identificado 10 compuestos candidatos que han sido capaces de suprimir los defectos motores en moscas mutantes *DJ-1β* y de incrementar la viabilidad de células mutantes *DJ-1* cultivadas en condiciones de EO.
3. La validez de este rastreo a gran escala queda respaldada por la identificación de los compuestos clonidina y bumetanida, que están siendo actualmente evaluados en ensayos clínicos como posibles tratamientos para la EP.
4. El zaprinast, uno de los compuestos identificado en el rastreo, suprime diferentes fenotipos en modelos en *Drosophila* y en células humanas de la EP. Su estudio nos ha permitido identificar el receptor GPR35 como una diana terapéutica para el tratamiento de la enfermedad.
5. La vincamina, uno de los compuestos identificado en el rastreo, suprime diferentes fenotipos en modelos en *Drosophila* y en células humanas de la EP. Su estudio nos ha permitido identificar el canal de Na⁺ dependiente de voltaje como una diana terapéutica para el tratamiento de la enfermedad.
6. Otros compuestos identificados en el rastreo a gran escala podrían ser futuros tratamientos para la EP por diferentes razones: presentan mecanismos de acción relacionados con la patología de la enfermedad (como el bloqueo de la sobreactivación de la microglía o la regulación de factores de transcripción como Nurr1 y Pitx3), han permitido identificar dianas terapéuticas novedosas (como los receptores α-adrenérgicos), o porque tanto ellos como compuestos similares han sido previamente estudiados en modelos preclínicos de la EP.
7. Algunos compuestos identificados en el rastreo primario que no fueron validados en las células SH-SY5Y podrían ejercer su función beneficiosa en las moscas modelo actuando sobre otros tipos celulares distintos a las neuronas, como son las células gliales. Esta hipótesis debe ser confirmada mediante la utilización de otros métodos de validación, como el co-cultivo de células gliales (microglía o astrocitos) y células SH-SY5Y deficientes en *DJ-1*.
8. Dos modelos de la EP en *Drosophila*, un modelo de la EPf basado en la mutación del gen *DJ-1β* y un modelo de la EPe inducido mediante rotenona, presentan alteraciones en el metabolismo de carbohidratos.

9. Las moscas modelo de la DMT2 y las de la EP presentan fenotipos similares. Además, hemos demostrado que las moscas modelo de la DMT2 acaban desarrollando defectos motores y alteraciones en las neuronas dopaminérgicas, lo que sugiere que la DMT2 puede actuar como un factor de riesgo de padecer la EP.
10. Las moscas mutantes *DJ-1 β* son más sensibles a condiciones de elevados niveles de azúcar. Además, la falta de función del gen *DJ-1 β* parece ejercer un efecto negativo sobre el metabolismo del glucógeno.
11. El aumento de los niveles de glucosa tiene un efecto perjudicial sobre la viabilidad de células de neuroblastoma, utilizadas para el estudio de la EP, a través de la activación del factor proapoptótico JNK.
12. La metformina, un fármaco antidiabético, suprime fenotipos tanto relacionados con la DMT2 como con la EP en las moscas modelo de la DMT2. Por otra parte, también capaz de aumentar la viabilidad de células deficientes en el gen *DJ-1*. Todos estos resultados confirman que la metformina puede ser un compuesto candidato para tratar la EP.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Salam, O. M. E., Hamdy, S. M., Seadawy, S. A. M., Galal, A. F., Abouelfadl, D. M., & Atrees, S. S. (2016). Effect of piracetam, vincamine, vinpocetine, and donepezil on oxidative stress and neurodegeneration induced by aluminum chloride in rats. *Comparative Clinical Pathology*, *25*(2), 305–318. <https://doi.org/10.1007/s00580-015-2182-0>
- Afentou, N., Jarl, J., Gerdtham, U.-G., & Saha, S. (2019). Economic Evaluation of Interventions in Parkinson's Disease: A Systematic Literature Review. *Movement Disorders Clinical Practice*, *6*(4), 282–290. <https://doi.org/10.1002/MDC3.12755>
- Ahmad, J., Haider, N., Khan, M. A., Md, S., Alhakamy, N. A., Ghoneim, M. M., Alshehri, S., Sarim Imam, S., Ahmad, M. Z., & Mishra, A. (2022). Novel therapeutic interventions for combating Parkinson's disease and prospects of Nose-to-Brain drug delivery. In *Biochemical Pharmacology* (Vol. 195). <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114849>
- Aldewachi, H., Al-Zidan, R. N., Conner, M. T., & Salman, M. M. (2021). High-Throughput Screening Platforms in the Discovery of Novel Drugs for Neurodegenerative Diseases. *Bioengineering*, *8*(2), 30. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8020030>
- Ali, A. A., Khalil, M. G., Abd El-latif, D. M., Okda, T., Abdelaziz, A. I., Abu-Elfotuh, karema, Kamal, M. M., & Wahid, A. (2022). The influence of vinpocetine alone or in combination with Epigallocatechin-3-gallate, Coenzyme COQ10, Vitamin E and Selenium as a potential neuroprotective combination against aluminium-induced Alzheimer's disease in Wistar Albino Rats. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, *98*. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2021.104557>
- Alvarez, J., Alvarez-Illera, P., García-Casas, P., Fonteriz, R. I., & Montero, M. (2020). The Role of Ca²⁺ Signaling in Aging and Neurodegeneration: Insights from *Caenorhabditis elegans* Models. *Cells*, *9*(1). <https://doi.org/10.3390/CELLS9010204>
- Álvarez-Rendón, J. P., Salceda, R., & Riesgo-Escovar, J. R. (2018). *Drosophila melanogaster* as a Model for Diabetes Type 2 Progression. *BioMed Research International*, *2018*. <https://doi.org/10.1155/2018/1417528>
- Ambacher, K. K., Pitzul, K. B., Karajgikar, M., Hamilton, A., Ferguson, S. S., & Cregan, S. P. (2012). The JNK- and AKT/GSK3 β - Signaling Pathways Converge to Regulate Puma Induction and Neuronal Apoptosis Induced by Trophic Factor Deprivation. *PLoS ONE*, *7*(10), e46885. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046885>
- Anandhan, A., Jacome, M. S., Lei, S., Hernandez-Franco, P., Pappa, A., Panayiotidis, M. I., Powers, R., & Franco, R. (2017). *Metabolic Dysfunction in Parkinson's Disease*

Bioenergetics, Redox Homeostasis and Central Carbon Metabolism.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.03.009>

- Andres-Mateos, E., Perier, C., Zhang, L., Blanchard-Fillion, B., Greco, T. M., Thomas, B., Han, S. K., Sasaki, M., Ischiropoulos, H., Przedborski, S., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2007). DJ-1 gene deletion reveals that DJ-1 is an atypical peroxiredoxin-like peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(37), 14807–14812. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703219104>
- Animaw, W., & Seyoum, Y. (2017). Increasing prevalence of diabetes mellitus in a developing country and its related factors. *PLoS ONE*, *12*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187670>
- Antony, P. M. A., Diederich, N. J., & Balling, R. (2011). Parkinson's disease mouse models in translational research. *Mammalian Genome*, *22*(7–8). <https://doi.org/10.1007/s00335-011-9330-x>
- Ariga, H., Takahashi-Niki, K., Kato, I., Maita, H., Niki, T., & Iguchi-Ariga, S. M. M. (2013). Neuroprotective function of DJ-1 in Parkinson's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2013*, 683920. <https://doi.org/10.1155/2013/683920>
- Aryal, B., & Lee, Y. (2019). Disease model organism for Parkinson disease: *Drosophila melanogaster*. *BMB Reports*, *52*(4), 250. <https://doi.org/10.5483/BMBREP.2019.52.4.204>
- Ashcroft, F. M., Rohm, M., Clark, A., & Brereton, M. F. (2017). Is Type 2 Diabetes a Glycogen Storage Disease of Pancreatic β Cells? In *Cell Metabolism* (Vol. 26, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.05.014>
- Athauda, D., & Foltynie, T. (2016). Challenges in detecting disease modification in Parkinson's disease clinical trials. In *Parkinsonism and Related Disorders* (Vol. 32, pp. 1–11). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.07.019>
- Avazzadeh, S., Baena, J. M., Keighron, C., Feller-Sanchez, Y., & Quinlan, L. R. (2021). Modelling parkinson's disease: Ipscs towards better understanding of human pathology. *Brain Sciences*, *11*(3). <https://doi.org/10.3390/brainsci11030373>
- Ayajuddin, M., Das, A., Phom, L., Modi, P., Chaurasia, R., Koza, Z., Thepa, A., Jamir, N., Singh, P. R., Longkumer, S., Lal, P., & Yeniseti, S. C. (2018). Parkinson's Disease: Insights from *Drosophila melanogaster* Model. In *Drosophila melanogaster - Model for Recent Advances in Genetics and Therapeutics*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72021>
- Balakrishnan, R., Azam, S., Cho, D. Y., Su-Kim, I., & Choi, D. K. (2021). Natural Phytochemicals as Novel Therapeutic Strategies to Prevent and Treat Parkinson's Disease: Current Knowledge and Future Perspectives. In *Oxidative*

- Bang, Y., Lim, J., & Choi, H. J. (2021). Recent advances in the pathology of prodromal non-motor symptoms olfactory deficit and depression in Parkinson's disease: clues to early diagnosis and effective treatment. In *Archives of Pharmacal Research* (Vol. 44, Issue 6). <https://doi.org/10.1007/s12272-021-01337-3>
- Biosa, A., Sandrelli, F., Beltramini, M., Greggio, E., Bubacco, L., & Bisaglia, M. (2017). Recent findings on the physiological function of DJ-1: Beyond Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 108, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.NBD.2017.08.005>
- Birse, R. T., Choi, J., Reardon, K., Rodriguez, J., Graham, S., Diop, S., Ocorr, K., Bodmer, R., & Oldham, S. (2010). High fat diet-induced obesity and heart dysfunction is regulated by the TOR pathway in Drosophila. *Cell Metabolism*, 12(5), 533. <https://doi.org/10.1016/j.CMET.2010.09.014>
- Błaszczuk, J. W. (2018). The emerging role of energy metabolism and neuroprotective strategies in Parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10(OCT), 301. <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2018.00301/BIBTEX>
- Blauwendraat, C., Nalls, M. A., & Singleton, A. B. (2020). The genetic architecture of Parkinson's disease. In *The Lancet Neurology* (Vol. 19, Issue 2, pp. 170–178). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30287-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30287-X)
- Blesa, J., & Przedborski, S. (2014). Parkinson's disease: Animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8(DEC). <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00155>
- Bloem, B. R., Okun, M. S., & Klein, C. (2021). Parkinson's disease. *The Lancet*, 397(10291), 2284–2303. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00218-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00218-X)
- Bolaños, J. P., Moro, M. A., Lizasoain, I., & Almeida, A. (2009). Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: Therapeutic implications. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 61, Issue 14, pp. 1299–1315). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.05.009>
- Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M. J., Schaap, O., Breedveld, G. J., Krieger, E., Dekker, M. C. J., Squitieri, F., Ibanez, P., Joosse, M., van Dongen, J. W., Vanacore, N., van Swieten, J. C., Brice, A., Meco, G., van Duijn, C. M., Oostra, B. A., & Heutink, P. (2003). Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*, 299(5604), 256–259. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1077209/SUPPL_FILE/PAP.PDF
- Bortolanza, M., Nascimento, G. C., Socias, S. B., Ploper, D., Chehín, R. N., Raisman-Vozari, R., & Del-Bel, E. (2018). Tetracycline repurposing in neurodegeneration:

- focus on Parkinson's disease. In *Journal of Neural Transmission* (Vol. 125, Issue 10). <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1913-1>
- Brauer, R., Wei, L., Ma, T., Athauda, D., Girges, C., Vijiaratnam, N., Auld, G., Whittlesea, C., Wong, I., & Foltynie, T. (2020). Diabetes medications and risk of Parkinson's disease: a cohort study of patients with diabetes. *Brain*, *143*(10), 3067–3076. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa262>
- Breda, C., Sathyaikumar, K. v., Idrissi, S. S., Notarangelo, F. M., Estranero, J. G., Moore, G. G. L., Green, E. W., Kyriacou, C. P., Schwarcz, R., & Giorgini, F. (2016). Tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) inhibition ameliorates neurodegeneration by modulation of kynurenine pathway metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(19), 5435–5440. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604453113>
- Broughton, S. J., Piper, M. D. W., Ikeya, T., Bass, T. M., Jacobson, J., Drieger, Y., Martinez, P., Hafen, E., Withers, D. J., Leever, S. J., & Partridge, L. (2005). Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(8), 3105–3110. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405775102>
- Buneeva, O. A., & Medvedev, A. E. (2021). DJ-1 Protein and Its Role in the Development of Parkinson's Disease: Studies on Experimental Models. *Biochemistry (Moscow)* *2021* *86:6*, *86*(6), 627–640. <https://doi.org/10.1134/S000629792106002X>
- Cai, R., Zhang, Y., Simmering, J. E., Schultz, J. L., Li, Y., Fernandez-Carasa, I., Consiglio, A., Raya, A., Polgreen, P. M., Narayanan, N. S., Yuan, Y., Chen, Z., Su, W., Han, Y., Zhao, C., Gao, L., Ji, X., Welsh, M. J., & Liu, L. (2019). Enhancing glycolysis attenuates Parkinson's disease progression in models and clinical databases. *Journal of Clinical Investigation*, *129*(10), 4539–4549. <https://doi.org/10.1172/JCI129987>
- Cao, J., Ni, J., Ma, W., Shi, V., Milla, L. A., Park, S., Spletter, M. L., Tang, S., Zhang, J., Wei, X., Kim, S. K., & Scott, M. P. (2014). Insight into insulin secretion from transcriptome and genetic analysis of insulin-producing cells of *Drosophila*. *Genetics*, *197*(1). <https://doi.org/10.1534/genetics.113.160663>
- Casani, S., Gómez-Pastor, R., Matallana, E., & Paricio, N. (2013). Antioxidant compound supplementation prevents oxidative damage in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, *61*, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.021>
- Chen, R., Park, H.-A., Mnatsakanyan, N., Niu, Y., Licznerski, P., Wu, J., Miranda, P., Graham, M., Tang, J., Boon, A. J. W., Cossu, G., Mandemakers, W., Bonifati, V., Smith, P. J. S., Alavian, K. N., & Jonas, E. A. (2019). Parkinson's disease protein DJ-1 regulates ATP synthase protein components to increase neuronal process

- outgrowth. *Cell Death & Disease*, 10(6). <https://doi.org/10.1038/S41419-019-1679-X>
- Cheong, J. L. Y., de Pablo-Fernandez, E., Foltynie, T., & Noyce, A. J. (2020). The Association Between Type 2 Diabetes Mellitus and Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's Disease*, 10(3), 775–789. <https://doi.org/10.3233/JPD-191900>
- Chomova, M. (2022). Toward the Decipherment of Molecular Interactions in the Diabetic Brain. In *Biomedicines* (Vol. 10, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10010115>
- Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2). <https://doi.org/10.1128/mnbr.65.2.232-260.2001>
- Cho, S. J., Kang, K. A., Piao, M. J., Ryu, Y. S., Fernando, P. D. S. M., Zhen, A. X., Hyun, Y. J., Ahn, M. J., Kang, H. K., & Hyun, J. W. (2019). 7,8-dihydroxyflavone protects high glucose-damaged neuronal cells against oxidative stress. *Biomolecules and Therapeutics*, 27(1). <https://doi.org/10.4062/biomolther.2018.202>
- Church, F. C. (2021). Review treatment options for motor and non-motor symptoms of parkinson's disease. In *Biomolecules* (Vol. 11, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/biom11040612>
- Constantino, A. E. A., & Honig, L. S. (2001). Parkinson's Disease. *Science of Aging Knowledge Environment*, 2001(7). <https://doi.org/10.1126/SAGEKE.2001.7.DN4>
- Cooper, J. F., & van Raamsdonk, J. M. (2018). Modeling Parkinson's disease in *C. elegans*. In *Journal of Parkinson's Disease* (Vol. 8, Issue 1). <https://doi.org/10.3233/JPD-171258>
- Cosi, C., Mannaioni, G., Cozzi, A., Carl, V., Sili, M., Cavone, L., Maratea, D., & Moroni, F. (2011). G-protein coupled receptor 35 (GPR35) activation and inflammatory pain: Studies on the antinociceptive effects of kynurenic acid and zaprinast. *Neuropharmacology*, 60(7–8), 1227–1231. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.11.014>
- Coulom, H., & Birman, S. (2004). Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neuroscience*, 24(48). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2993-04.2004>
- Coutinho, A. E., & Chapman, K. E. (2011). The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. In *Molecular and Cellular Endocrinology* (Vol. 335, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.04.005>

- Day, J. O., & Mullin, S. (2021). The genetics of parkinson's disease and implications for clinical practice. In *Genes* (Vol. 12, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/genes12071006>
- Day, J. P., Dow, J. A. T., Houslay, M. D., & Davies, S.-A. (2005). Cyclic nucleotide phosphodiesterases in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical Journal*, 388(Pt 1), 333. <https://doi.org/10.1042/BJ20050057>
- de Iuliis, A., Montinaro, E., Fatati, G., Plebani, M., & Colosimo, C. (2022). Diabetes mellitus and Parkinson's disease: Dangerous liaisons between insulin and dopamine. In *Neural Regeneration Research* (Vol. 17, Issue 3). <https://doi.org/10.4103/1673-5374.320965>
- Deshmukh, C. D., & Jain, A. (2015). Diabetes Mellitus: A Review. In *Int. J. Pure App. Biosci* (Vol. 3, Issue 3). www.ijpab.com
- Dhanasekaran, D. N., & Premkumar Reddy, E. (2017). JNK-signaling: A multiplexing hub in programmed cell death. In *Genes and Cancer* (Vol. 8, Issues 9–10, pp. 682–694). Impact Journals LLC. <https://doi.org/10.18632/genesandcancer.155>
- Divorty, N., Mackenzie, A. E., Nicklin, S. A., & Milligan, G. (2015). G protein-coupled receptor 35: an emerging target in inflammatory and cardiovascular disease. *Frontiers in Pharmacology*, 6(MAR), 41. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00041>
- Dolgacheva, L. P., Berezhnov, A. v., Fedotova, E. I., Zinchenko, V. P., & Abramov, A. Y. (2019). Role of DJ-1 in the mechanism of pathogenesis of Parkinson's disease. In *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* (Vol. 51, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s10863-019-09798-4>
- Dorsey, E. R., Sherer, T., Okun, M. S., & Bloem, B. R. (2018). The emerging evidence of the Parkinson pandemic. In *Journal of Parkinson's Disease* (Vol. 8, Issue s1). <https://doi.org/10.3233/JPD-181474>
- Du, T., Yang, L., Xu, X., Shi, X., Xu, X., Lu, J., Lv, J., Huang, X., Chen, J., Wang, H., Ye, J., Hu, L., & Shen, X. (2019). Vincamine as a GPR40 agonist improves glucose homeostasis in type 2 diabetic mice. *Journal of Endocrinology*, 240(2). <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0432>
- Du, Y., Ma, Z., Lin, S., Dodel, R. C., Gao, F., Bales, K. R., Triarhou, L. C., Chernet, E., Perry, K. W., Nelson, D. L. G., Luecke, S., Phebus, L. A., Bymaster, F. P., & Paul, S. M. (2001). Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(25). <https://doi.org/10.1073/pnas.251341998>

- Dwivedi, V., & Lakhota, S. C. (2016). Ayurvedic Amalaki Rasayana promotes improved stress tolerance and thus has anti-aging effects in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biosciences*, 41(4), 697–711. <https://doi.org/10.1007/S12038-016-9641-X/FIGURES/5>
- El-Gamal, M., Salama, M., Collins-Praino, L. E., Baetu, I., Fathalla, A. M., Soliman, A. M., Mohamed, W., & Moustafa, A. A. (2021). Neurotoxin-Induced Rodent Models of Parkinson's Disease: Benefits and Drawbacks. In *Neurotoxicity Research* (Vol. 39, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s12640-021-00356-8>
- Elkouzi, A., Vedam-Mai, V., Eisinger, R. S., & Okun, M. S. (2019). Emerging therapies in Parkinson disease — repurposed drugs and new approaches. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 15, Issue 4, pp. 204–223). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0155-7>
- Erekat, N. S. (2018). Apoptosis and its Role in Parkinson's Disease. In *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects* (pp. 65–82). Codon Publications. <https://doi.org/10.15586/codonpublications.parkinsonsdisease.2018.ch4>
- Esteves, M., Cristóvão, A. C., Saraiva, T., Rocha, S. M., Baltazar, G., Ferreira, L., & Bernardino, L. (2015). Retinoic acid-loaded polymeric nanoparticles induce neuroprotection in a mouse model for parkinson's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7(MAR). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00020>
- Fayed, A. H. A. (2010). Brain trace element concentration of rats treated with the plant alkaloid, Vincamine. *Biological Trace Element Research*, 136(3), 314–319. <https://doi.org/10.1007/s12011-009-8550-3>
- Felix, J. P., Williams, B. S., Priest, B. T., Brochu, R. M., Dick, I. E., Warren, V. A., Yan, L., Slaughter, R. S., Kaczorowski, G. J., Smith, M. M., & Garcia, M. L. (2004). Functional assay of voltage-gated sodium channels using membrane potential-sensitive dyes. *Assay and Drug Development Technologies*, 2(3). <https://doi.org/10.1089/1540658041410696>
- Feraco, P., Gagliardo, C., la Tona, G., Bruno, E., D'angelo, C., Marrale, M., del Poggio, A., Malaguti, M. C., Geraci, L., Baschi, R., Petralia, B., Midiri, M., & Monastero, R. (2021). Imaging of substantia nigra in parkinson's disease: A narrative review. In *Brain Sciences* (Vol. 11, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/brainsci11060769>
- Fernandez-Ayala, D. J. M., Sanz, A., Vartiainen, S., Kemppainen, K. K., Babusiak, M., Mustalahti, E., Costa, R., Tuomela, T., Zeviani, M., Chung, J., O'Dell, K. M. C., Rustin, P., & Jacobs, H. T. (2009). Expression of the Ciona intestinalis Alternative Oxidase (AOX) in *Drosophila* Complements Defects in Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *Cell Metabolism*, 9(5), 449–460. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2009.03.004>

- Figlewicz, D. P., Brot, M. D., McCall, A. L., & Szot, P. (1996). Diabetes causes differential changes in CNS noradrenergic and dopaminergic neurons in the rat: A molecular study. *Brain Research*, 736(1–2). [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00727-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00727-5)
- Fiory, F., Perruolo, G., Cimmino, I., Cabaro, S., Pignalosa, F. C., Miele, C., Beguinot, F., Formisano, P., & Oriente, F. (2019). The Relevance of Insulin Action in the Dopaminergic System. *Frontiers in Neuroscience*, 0, 868. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2019.00868>
- Fletcher, E. J. R., Kaminski, T., Williams, G., & Duty, S. (2021). Drug repurposing strategies of relevance for Parkinson’s disease. In *Pharmacology Research and Perspectives* (Vol. 9, Issue 4). <https://doi.org/10.1002/prp2.841>
- Foray, V., Pelisson, P. F., Bel-Venner, M. C., Desouhant, E., Venner, S., Menu, F., Giron, D., & Rey, B. (2012). A handbook for uncovering the complete energetic budget in insects: The van Handel’s method (1985) revisited. *Physiological Entomology*, 37(3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2012.00831.x>
- Fukuwatari, T. (2020). Possibility of amino acid treatment to prevent the psychiatric disorders via modulation of the production of tryptophan metabolite kynurenic acid. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12051403>
- Gáliková, M., & Klepsatel, P. (2018). Obesity and aging in the Drosophila model. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/ijms19071896>
- Gao, H. M., Liu, B., Zhang, W., & Hong, J. S. (2003). Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson’s disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(8). [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(03\)00176-7](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(03)00176-7)
- Gasparini, F., & di Paolo, T. (2019). Drug repurposing: Old drugs, new tricks to fast track drug development for the brain. In *Neuropharmacology* (Vol. 147, pp. 1–3). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.01.009>
- Genders, A. J., Bradley, E. A., Rattigan, S., & Richards, S. M. (2011). cGMP phosphodiesterase inhibition improves the vascular and metabolic actions of insulin in skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 301(2), E342–E350. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00691.2010>
- Giachin, G., Bouverot, R., Acaijaoui, S., Pantalone, S., & Soler-López, M. (2016). Dynamics of human mitochondrial complex I assembly: Implications for neurodegenerative diseases. In *Frontiers in Molecular Biosciences* (Vol. 3, Issue AUG, p. 43). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00043>

- Goetz, C. G. (2011). The history of Parkinson's disease: Early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008862>
- Gouda, N. A., Elkamhawy, A., & Cho, J. (2022). Emerging Therapeutic Strategies for Parkinson's Disease and Future Prospects: A 2021 Update. *Biomedicines*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES10020371>
- Graham, P., & Pick, L. (2017). Drosophila as a Model for Diabetes and Diseases of Insulin Resistance. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 121). <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.07.011>
- Gralle, M. (2017). The neuronal insulin receptor in its environment. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 140, Issue 3). <https://doi.org/10.1111/jnc.13909>
- Grau, C. M., & Greene, L. A. (2012). Use of PC12 cells and rat superior cervical ganglion sympathetic neurons as models for neuroprotective assays relevant to parkinson's disease. *Methods in Molecular Biology*, 846. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-536-7_18
- Greene, J. C., Whitworth, A. J., Kuo, I., Andrews, L. A., Feany, M. B., & Pallanck, L. J. (2003). Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in Drosophila parkin mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 4078–4083. <https://doi.org/10.1073/pnas.0737556100>
- Groenendyk, J., Agellon, L. B., & Michalak, M. (2021). Calcium signaling and endoplasmic reticulum stress. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 363). <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2021.03.003>
- Grünewald, A., Kumar, K. R., & Sue, C. M. (2019). New insights into the complex role of mitochondria in Parkinson's disease. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 177, pp. 73–93). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.09.003>
- Guo, J., Williams, D. J., Puhl, H. L., & Ikeda, S. R. (2008). Inhibition of N-type calcium channels by activation of GPR35, an orphan receptor, heterologously expressed in rat sympathetic neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 324(1), 342–351. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.127266>
- Gupta, H. P., Jha, R. R., Ahmad, H., Patel, D. K., & Ravi Ram, K. (2019). Xenobiotic mediated diabetogenesis: Developmental exposure to dichlorvos or atrazine leads to type 1 or type 2 diabetes in Drosophila. *Free Radical Biology and Medicine*, 141. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.07.013>
- Han, J., Nepal, P., Odelade, A., Freely, F. D., Belton, D. M., Graves, J. L., & Maldonado-Devincci, A. M. (2021). High-Fat Diet-Induced Weight Gain, Behavioral Deficits, and Dopamine Changes in Young C57BL/6J Mice. *Frontiers in Nutrition*, 7. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.591161>

- Han, J., Qu, Q., Qiao, J., & Zhang, J. (2017). Vincamine alleviates amyloid- β 25-35 peptides-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Pharmacognosy Magazine*, *13*(49). <https://doi.org/10.4103/0973-1296.196309>
- Hao, L. Y., Giasson, B. I., & Bonini, N. M. (2010). DJ-1 is critical for mitochondrial function and rescues PINK1 loss of function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(21), 9747–9752. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0911175107/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Hassan, A., Kandel, R. S., Mishra, R., Gautam, J., Alaref, A., & Jahan, N. (2020). Diabetes Mellitus and Parkinson's Disease: Shared Pathophysiological Links and Possible Therapeutic Implications. *Cureus*, *12*(8). <https://doi.org/10.7759/CUREUS.9853>
- Hauser, R. A., LeWitt, P. A., & Comella, C. L. (2021). On demand therapy for Parkinson's disease patients: Opportunities and choices. In *Postgraduate Medicine* (Vol. 133, Issue 7). <https://doi.org/10.1080/00325481.2021.1936087>
- Havelund, J. F., Andersen, A. D., Binzer, M., Blaabjerg, M., Heegaard, N. H. H., Stenager, E., Færgeman, N. J., & Gramsbergen, J. B. (2017). Changes in kynurenine pathway metabolism in Parkinson patients with L-DOPA-induced dyskinesia. *Journal of Neurochemistry*, *142*(5), 756–766. <https://doi.org/10.1111/jnc.14104>
- Herrero, M. T., Estrada, C., Maatouk, L., & Vyas, S. (2015). Inflammation in Parkinson's disease: Role of glucocorticoids. In *Frontiers in Neuroanatomy* (Vol. 9, Issue APR). <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00032>
- Heslop, K. A., Rovini, A., Hunt, E. G., Fang, D., Morris, M. E., Christie, C. F., Gooz, M. B., DeHart, D. N., Dang, Y., Lemasters, J. J., & Maldonado, E. N. (2020). JNK activation and translocation to mitochondria mediates mitochondrial dysfunction and cell death induced by VDAC opening and sorafenib in hepatocarcinoma cells. *Biochemical Pharmacology*, *171*, 113728. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113728>
- Homberg, J. R., Kyzar, E. J., Stewart, A. M., Nguyen, M., Poudel, M. K., Echevarria, D. J., Collier, A. D., Gaikwad, S., Klimenko, V. M., Norton, W., Pittman, J., Nakamura, S., Koshiba, M., Yamanouchi, H., Apyatin, S. A., Scattoni, M. L., Diamond, D. M., Ullmann, J. F., Parker, M. O., ... Kalueff, A. v. (2016). Improving treatment of neurodevelopmental disorders: recommendations based on preclinical studies. *Expert Opinion on Drug Discovery*, *11*(1), 11–25. <https://doi.org/10.1517/17460441.2016.1115834>
- Ho, M. S. (2019). Microglia in parkinson's disease. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1175). https://doi.org/10.1007/978-981-13-9913-8_13

- Hong, C. T., Chen, K. Y., Wang, W., Chiu, J. Y., Wu, D., Chao, T. Y., Hu, C. J., Chau, K. Y. D., & Bamodu, O. A. (2020). Insulin Resistance Promotes Parkinson's Disease through Aberrant Expression of α -Synuclein, Mitochondrial Dysfunction, and Deregulation of the Polo-Like Kinase 2 Signaling. *Cells*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/cells9030740>
- Huang, M., & Chen, S. (2021). DJ-1 in neurodegenerative diseases: Pathogenesis and clinical application. *Progress in Neurobiology*, 204, 102114. <https://doi.org/10.1016/j.PNEUROBIO.2021.102114>
- Hwang, S., Song, S., Hong, Y. K., Choi, G., Suh, Y. S., Han, S. Y., Lee, M., Park, S. H., Lee, J. H., Lee, S., Bang, S. M., Jeong, Y., Chung, W. J., Lee, I. S., Jeong, G., Chung, J., & Cho, K. S. (2013). Drosophila DJ-1 Decreases Neural Sensitivity to Stress by Negatively Regulating Daxx-Like Protein through dFOXO. *PLoS Genetics*, 9(4), 1003412. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1003412>
- Innos, J., & Hickey, M. A. (2021). Using Rotenone to Model Parkinson's Disease in Mice: A Review of the Role of Pharmacokinetics. In *Chemical Research in Toxicology* (Vol. 34, Issue 5, pp. 1223–1239). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.0c00522>
- Ishola, I. O., Akinyede, A. A., Adeluwa, T. P., & Micah, C. (2018). Novel action of vinpocetine in the prevention of paraquat-induced parkinsonism in mice: involvement of oxidative stress and neuroinflammation. *Metabolic Brain Disease*, 33(5). <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0256-9>
- Jagmag, S. A., Tripathi, N., Shukla, S. D., Maiti, S., & Khurana, S. (2016). Evaluation of models of Parkinson's disease. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 9, Issue JAN). <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00503>
- Jain, D., Jain, R., Eberhard, D., Eglinger, J., Bugliani, M., Piemonti, L., Marchetti, P., & Lammert, E. (2012). Age-and diet-dependent requirement of DJ-1 for glucose homeostasis in mice with implications for human type 2 diabetes. *Journal of Molecular Cell Biology*, 4(4). <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjs025>
- Jang, Y., Lee, M. J., Han, J., Kim, S. J., Ryu, I., Ju, X., Ryu, M. J., Chung, W., Oh, E., Kweon, G. R., & Heo, J. Y. (2017). A high-fat diet induces a loss of midbrain dopaminergic neuronal function that underlies motor abnormalities. *Experimental Neurobiology*, 26(2). <https://doi.org/10.5607/en.2017.26.2.104>
- Jeon, K. I., Xu, X., Aizawa, T., Lim, J. H., Jono, H., Kwon, D. S., Abe, J. I., Berk, B. C., Li, J. D., & Yan, C. (2010). Vinpocetine inhibits NF- κ B-dependent inflammation via an IKK-dependent but PDE-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(21). <https://doi.org/10.1073/pnas.0914414107>

- Joshi, R., Kadeer, N., Sheriff, S., Friend, L. A., James, J. H., & Balasubramaniam, A. (2014). Phosphodiesterase (PDE) inhibitor torbafylline (HWA 448) attenuates burn-induced rat skeletal muscle proteolysis through the PDE4/cAMP/EPAC/PI3K/Akt pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 393(1–2), 152–163. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.06.012>
- Jung, U., & Choi, M.-S. (2014). Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(4), 6184–6223. <https://doi.org/10.3390/ijms15046184>
- Kaiserova, M., Grambalova, Z., Kurcova, S., Otruba, P., Vranova, H. P., Mensikova, K., & Kanovsky, P. (2021). Premotor parkinson's disease: Overview of clinical symptoms and current diagnostic methods. *Biomedical Papers*, 165(2). <https://doi.org/10.5507/bp.2021.002>
- Kelly, M. P. (2018). Cyclic nucleotide signaling changes associated with normal aging and age-related diseases of the brain. In *Cellular Signalling* (Vol. 42, pp. 281–291). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.11.004>
- Kharroubi, A. T. (2015). Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World Journal of Diabetes*, 6(6). <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i6.850>
- Kim, E. Y., Kang, K. hwa, & Koh, H. (2018). Cyclophilin 1 (Cyp1) mutation ameliorates oxidative stress-induced defects in a Drosophila DJ-1 null mutant. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 505(3), 823–829. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.014>
- Kim, H. J., Seo, J. Y., Suh, H. J., Lim, S. S., & Kim, J. S. (2012). Antioxidant activities of licorice-derived prenylflavonoids. *Nutrition Research and Practice*, 6(6), 491–498. <https://doi.org/10.4162/nrp.2012.6.6.491>
- Kim, J., Koo, B. K., & Knoblich, J. A. (2020). Human organoids: model systems for human biology and medicine. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 21, Issue 10). <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0259-3>
- Konnova, E. A., & Swanberg, M. (2018). Animal Models of Parkinson's Disease. *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*, 83–106. <https://doi.org/10.15586/CODONPUBLICATIONS.PARKINSONSDISEASE.2018.CH5>
- Koszła, O., Stępnicki, P., Zięba, A., Grudzińska, A., Matosiuk, D., & Kaczor, A. A. (2021). Current approaches and tools used in drug development against parkinson's disease. In *Biomolecules* (Vol. 11, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/biom11060897>

- Krebiehl, G., Ruckerbauer, S., Burbulla, L. F., Kieper, N., Maurer, B., Waak, J., Wolburg, H., Gizatullina, Z., Gellerich, F. N., Voitalla, D., Riess, O., Kahle, P. J., Proikas-Cezanne, T., & Krüger, R. (2010). Reduced Basal Autophagy and Impaired Mitochondrial Dynamics Due to Loss of Parkinson's Disease-Associated Protein DJ-1. *PLoS ONE*, *5*(2), e9367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009367>
- Krentz, A. J., Weyer, C., & Hompesch, M. (2019). Translational research methods in diabetes, obesity, and nonalcoholic fatty liver disease: A focus on early phase clinical drug development. In *Translational Research Methods in Diabetes, Obesity, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Focus on Early Phase Clinical Drug Development*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-11748-1>
- Kudryavtseva, A. v., Krasnov, G. S., Dmitriev, A. A., Alekseev, B. Y., Kardymon, O. L., Sadritdinova, A. F., Fedorova, M. S., Pokrovsky, A. v., Melnikova, N. v., Kaprin, A. D., Moskalev, A. A., & Snezhkina, A. v. (2016). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*, *7*(29). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9821>
- Labandeira, C., Fraga-Bau, A., Arias Ron, D., Alvarez-Rodriguez, E., Vicente-Alba, P., Lago-Garma, J., & Rodriguez-Perez, A. (2022). Parkinson's disease and diabetes mellitus: Common mechanisms and treatment repurposing. In *Neural Regeneration Research* (Vol. 17, Issue 8, pp. 1652–1658). Wolters Kluwer Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.332122>
- Lavara-Culebras, E., Muñoz-Soriano, V., Gómez-Pastor, R., Matallana, E., & Paricio, N. (2010). Effects of pharmacological agents on the lifespan phenotype of *Drosophila* DJ-1 β mutants. *Gene*, *462*(1–2), 26–33. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2010.04.009>
- Lavara-Culebras, E., & Paricio, N. (2007). *Drosophila* DJ-1 mutants are sensitive to oxidative stress and show reduced lifespan and motor deficits. *Gene*, *400*(1–2), 158–165. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2007.06.013>
- Lazzarini, M., Martin, S., Mitkovski, M., Vozari, R. R., Stühmer, W., & Bel, E. del. (2013). Doxycycline restrains glia and confers neuroprotection in a 6-OHDA Parkinson model. *GLIA*, *61*(7). <https://doi.org/10.1002/glia.22496>
- Lecours, C., Bordeleau, M., Cantin, L., Parent, M., di Paolo, T., & Tremblay, M. È. (2018). Microglial implication in Parkinson's disease: Loss of beneficial physiological roles or gain of inflammatory functions? In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00282>
- Lee, T. K., & Yankee, E. L. (2021). A review on Parkinson's disease treatment. (CC BY 4.0). *Neuroimmunology and Neuroinflammation*, *8*.

- Liesa, M., & Shirihai, O. S. (2013). Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. In *Cell Metabolism* (Vol. 17, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.002>
- Liguori, F., Mascolo, E., & Vernì, F. (2021). The genetics of diabetes: What we can learn from Drosophila. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 20). <https://doi.org/10.3390/ijms222011295>
- Li, J., Wu, H., & Zhang, J. (2022). Efficacy of phentolamine combined with ambroxol aerosol inhalation in the treatment of pediatric severe pneumonia and its effect on serum IL-10 and CRP levels. *Translational Pediatrics*, 11(1), 33–40. <https://doi.org/10.21037/tp-21-516>
- Liu, W., Lao, W., Zhang, R., & Zhu, H. (2021). Altered expression of voltage gated sodium channel Nav1.1 is involved in motor ability in MPTP-treated mice. *Brain Research Bulletin*, 170, 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2021.02.017>
- Lu, M., Su, C., Qiao, C., Bian, Y., Ding, J., & Hu, G. (2016). Metformin prevents dopaminergic neuron death in MPTP/P-induced mouse model of Parkinson's disease via autophagy and mitochondrial ROS clearance. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 19(9). <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyw047>
- Mackenzie, A. E., & Milligan, G. (2017). The emerging pharmacology and function of GPR35 in the nervous system. In *Neuropharmacology* (Vol. 113, Issue Pt B, pp. 661–671). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.07.035>
- Mahlknecht, P., Marini, K., Werkmann, M., Poewe, W., & Seppi, K. (2022). Prodromal Parkinson's disease: hype or hope for disease-modification trials? *Translational Neurodegeneration*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/S40035-022-00286-1>
- Mahmood, A., Shah, A. A., Umair, M., Wu, Y., & Khan, A. (2021). Recalling the pathology of Parkinson's disease; lacking exact figure of prevalence and genetic evidence in Asia with an alarming outcome: A time to step-up. In *Clinical Genetics* (Vol. 100, Issue 6). <https://doi.org/10.1111/cge.14019>
- Majali, M. al, Sunnaa, M., & Chand, P. (2021). Emerging Pharmacotherapies for Motor Symptoms in Parkinson's Disease. In *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* (Vol. 34, Issue 4). <https://doi.org/10.1177/08919887211018275>
- Markulin, I., Matasin, M., Turk, V. E., & Salković-Petrisic, M. (2022). Challenges of repurposing tetracyclines for the treatment of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission* 2022, 1, 1–32. <https://doi.org/10.1007/S00702-021-02457-2>
- Marotta, N., Kim, S., & Krainc, D. (2020). Organoid and pluripotent stem cells in Parkinson's disease modeling: an expert view on their value to drug discovery.

- In *Expert Opinion on Drug Discovery* (Vol. 15, Issue 4).
<https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1703671>
- Martinez-Perez, D. A., Jimenez-Del-Rio, M., & Velez-Pardo, C. (2018). Epigallocatechin-3-Gallate Protects and Prevents Paraquat-Induced Oxidative Stress and Neurodegeneration in Knockdown dj-1- β *Drosophila melanogaster*. *Neurotoxicity Research*, 34(3), 401–416. <https://doi.org/10.1007/S12640-018-9899-X/FIGURES/11>
- Maruthi Prasad, E., & Hung, S. Y. (2021). Current therapies in clinical trials of parkinson's disease: A 2021 update. *Pharmaceuticals*, 14(8). <https://doi.org/10.3390/ph14080717>
- Matsumoto, Y., Sumiya, E., Sugita, T., & Sekimizu, K. (2011). An invertebrate hyperglycemic model for the identification of anti-diabetic drugs. *PLoS ONE*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018292>
- McFarthing, K., Rafaloff, G., Baptista, M. A. S., Wyse, R. K., & Stott, S. R. W. (2021). Parkinson's Disease Drug Therapies in the Clinical Trial Pipeline: 2021 Update. In *Journal of Parkinson's Disease* (Vol. 11, Issue 3). <https://doi.org/10.3233/JPD-219006>
- Medina, A. E. (2011). Therapeutic utility of phosphodiesterase type I inhibitors in neurological conditions. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 5, Issue FEB). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fnins.2011.00021>
- Mencke, P., Boussaad, I., Romano, C. D., Kitami, T., Linster, C. L., & Krüger, R. (2021). The role of dj-1 in cellular metabolism and pathophysiological implications for parkinson's disease. In *Cells* (Vol. 10, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/cells10020347>
- Mesquita, C. S., Oliveira, R., Bento, F., Geraldo, D., Rodrigues, J. v., & Marcos, J. C. (2014). Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical Biochemistry*, 458, 69–71. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.04.034>
- Meulener, M., Whitworth, A. J., Armstrong-Gold, C. E., Rizzu, P., Heutink, P., Wes, P. D., Pallanck, L. J., & Bonini, N. M. (2005). *Drosophila* DJ-1 Mutants Are Selectively Sensitive to Environmental Toxins Associated with Parkinson's Disease. *Current Biology*, 15(17), 1572–1577. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2005.07.064>
- Michailidis, M., Moraitou, D., Tata, D. A., Kalinderi, K., Papamitsou, T., & Papaliagkas, V. (2022). Alzheimer's Disease as Type 3 Diabetes: Common Pathophysiological Mechanisms between Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2687. <https://doi.org/10.3390/ijms23052687>

- Mittal, S., Bjørnevik, K., Im, D. S., Flierl, A., Dong, X., Locascio, J. J., Abo, K. M., Long, E., Jin, M., Xu, B., Xiang, Y. K., Rochet, J. C., England, A., Rizzu, P., Heutink, P., Bartels, T., Selkoe, D. J., Caldarone, B. J., Glicksman, M. A., ... Scherzer, C. R. (2017). β 2-Adrenoreceptor is a regulator of the α -synuclein gene driving risk of Parkinson's disease. *Science*, 357(6354), 891–898. <https://doi.org/10.1126/science.aaf3934>
- Molina-Mateo, D., Fuenzalida-Uribe, N., Hidalgo, S., Molina-Fernández, C., Abarca, J., Zárate, R. v., Escandón, M., Figueroa, R., Tevy, M. F., & Campusano, J. M. (2017). Characterization of a presymptomatic stage in a Drosophila Parkinson's disease model: Unveiling dopaminergic compensatory mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1863(11). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.07.013>
- Morris, S. N. S., Coogan, C., Chamseddin, K., Fernandez-Kim, S. O., Kolli, S., Keller, J. N., & Bauer, J. H. (2012). Development of diet-induced insulin resistance in adult Drosophila melanogaster. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(8), 1230–1237. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.04.012>
- Moulin, T. C., Ferro, F., Hoyer, A., Cheung, P., Williams, M. J., & Schiöth, H. B. (2021). The Drosophila melanogaster Levodopa-Induced Depression Model Exhibits Negative Geotaxis Deficits and Differential Gene Expression in Males and Females. *Frontiers in Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.653470>
- Murillo-Maldonado, J. M., Sánchez-Chávez, G., Salgado, L. M., Salceda, R., & Riesgo-Escovar, J. R. (2011). Drosophila Insulin Pathway Mutants Affect Visual Physiology and Brain Function Besides Growth, Lipid, and Carbohydrate Metabolism. *Diabetes*, 60(5), 1632. <https://doi.org/10.2337/DB10-1288>
- Musco, V. J., Annesley, S. J., & Fisher, P. R. (2020). The DJ-1 gene and protein: links with Parkinson's disease. In *Genetics, Neurology, Behavior, and Diet in Parkinson's Disease*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815950-7.00003-5>
- Neves, M., Grãos, M., Anjo, S. I., & Manadas, B. (2022). Modulation of signaling pathways by DJ-1: An updated overview. *Redox Biology*, 51, 102283. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102283>
- Ntetsika, T., Papatoma, P. E., & Markaki, I. (2021). Novel targeted therapies for Parkinson's disease. In *Molecular Medicine* (Vol. 27, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s10020-021-00279-2>
- Nthenge-Ngumbau, D. N., & Mohanakumar, K. P. (2018). Can Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Inhibitors Be Drugs for Parkinson's Disease? In *Molecular Neurobiology* (Vol. 55, Issue 1, pp. 822–834). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0355-8>

- Pajares, M., I Rojo, A., Manda, G., Boscá, L., & Cuadrado, A. (2020). Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. In *Cells* (Vol. 9, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/cells9071687>
- Park, J. S., Davis, R. L., & Sue, C. M. (2018). Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: New Mechanistic Insights and Therapeutic Perspectives. In *Current Neurology and Neuroscience Reports* (Vol. 18, Issue 5). Current Medicine Group LLC 1. <https://doi.org/10.1007/s11910-018-0829-3>
- Park, J., Sung, Y. K., Cha, G. H., Sung, B. L., Kim, S., & Chung, J. (2005). Drosophila DJ-1 mutants show oxidative stress-sensitive locomotive dysfunction. *Gene*, *361*(1–2), 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.06.040>
- Pasco, M. Y., & Léopold, P. (2012). High Sugar-Induced Insulin Resistance in Drosophila Relies on the Lipocalin Neural Lazarillo. *PLOS ONE*, *7*(5), e36583. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0036583>
- Paudel, Y. N., Angelopoulou, E., Piperi, C., Shaikh, M. F., & Othman, I. (2020). Emerging neuroprotective effect of metformin in Parkinson's disease: A molecular crosstalk. In *Pharmacological Research* (Vol. 152). <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104593>
- Peixoto, C. A., Nunes, A. K. S., & Garcia-Osta, A. (2015). Phosphodiesterase-5 inhibitors: Action on the signaling pathways of neuroinflammation, neurodegeneration, and cognition. In *Mediators of Inflammation* (Vol. 2015). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2015/940207>
- Perier, C., & Vila, M. (2012). Mitochondrial Biology and Parkinson's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(2). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A009332>
- Picconi, B., Bagetta, V., Ghiglieri, V., Paillé, V., di Filippo, M., Pendolino, V., Tozzi, A., Giampà, C., Fusco, F. R., Sgobio, C., & Calabresi, P. (2011). Inhibition of phosphodiesterases rescues striatal long-term depression and reduces levodopa-induced dyskinesia. *Brain*, *134*(2), 375–387. <https://doi.org/10.1093/brain/awq342>
- Ping, Z., Xiaomu, W., Xufang, X., & Liang, S. (2019). Vinpocetine regulates levels of circulating TLRs in Parkinson's disease patients. *Neurological Sciences*, *40*(1). <https://doi.org/10.1007/s10072-018-3592-y>
- Plosker, G. L., & Croom, K. F. (2005). Sulfasalazine: A review of its use in the management of rheumatoid arthritis. In *Drugs* (Vol. 65, Issue 13). <https://doi.org/10.2165/00003495-200565130-00008>
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A. E., & Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers* *2017 3:1*, *3*(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>

- Poudel, S., & Lee, Y. (2018). Impaired taste associative memory and memory enhancement by feeding omija in parkinson's disease fly model. *Molecules and Cells*, 41(7). <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0014>
- Pozo Devoto, V. M., & Falzone, T. L. (2017). Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease: A role for α -synuclein? In *DMM Disease Models and Mechanisms* (Vol. 10, Issue 9, pp. 1075–1087). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/dmm.026294>
- Quinn, P. M. J., Moreira, P. I., Ambrósio, A. F., & Alves, C. H. (2020). PINK1/PARKIN signalling in neurodegeneration and neuroinflammation. In *Acta neuropathologica communications* (Vol. 8, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s40478-020-01062-w>
- Quon, T., Lin, L.-C., Ganguly, A., Tobin, A. B., & Milligan, G. (2020). Therapeutic Opportunities and Challenges in Targeting the Orphan G Protein-Coupled Receptor GPR35. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 3(5), 801–812. <https://doi.org/10.1021/ACSPTSCI.0C00079>
- Racette, B. A., Gross, A., Vouri, S. M., Camacho-Soto, A., Willis, A. W., & Searles Nielsen, S. (2018). Immunosuppressants and risk of Parkinson disease. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 5(7). <https://doi.org/10.1002/acn3.580>
- Rai, S. N., Singh, P., Varshney, R., Chaturvedi, V. K., Vamanu, E., Singh, M. P., & Singh, B. K. (2021). Promising drug targets and associated therapeutic interventions in Parkinson's disease. In *Neural Regeneration Research* (Vol. 16, Issue 9). <https://doi.org/10.4103/1673-5374.306066>
- Ramalingam, M., & Kim, S. (2016a). The Neuroprotective Role of Insulin Against MPP⁺-Induced Parkinson's Disease in Differentiated SH-SY5Y Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 117(4), 917–926. <https://doi.org/10.1002/jcb.25376>
- Ramalingam, M., & Kim, S.-J. (2016b). Insulin involved Akt/ERK and Bcl-2/Bax pathways against oxidative damages in C6 glial cells. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 36(1), 14–20. <https://doi.org/10.3109/10799893.2014.970276>
- Ramsey, C. P., & Giasson, B. I. (2010). L10p and P158DEL DJ-1 mutations cause protein instability, aggregation, and dimerization impairments. *Journal of Neuroscience Research*, 88(14), 3111–3124. <https://doi.org/10.1002/jnr.22477>
- Raniga, P. v., di Trapani, G., & Tonissen, K. F. (2017). The multifaceted roles of DJ-1 as an antioxidant. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1037, pp. 67–87). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6583-5_6

- Reed, J., Bain, S., & Kanamarlapudi, V. (2021). A review of current trends with type 2 diabetes epidemiology, aetiology, pathogenesis, treatments and future perspectives. In *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* (Vol. 14). <https://doi.org/10.2147/DMSO.S319895>
- Reggio, P. H., & Shore, D. M. (2015). The therapeutic potential of orphan GPCRs, GPR35 and GPR55. *Frontiers in Pharmacology*, 6(MAR). <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00069>
- Renaud, J., Bassareo, V., Beaulieu, J., Pinna, A., Schlich, M., Lavoie, C., Murtas, D., Simola, N., & Martinoli, M. G. (2018). Dopaminergic neurodegeneration in a rat model of long-term hyperglycemia: preferential degeneration of the nigrostriatal motor pathway. *Neurobiology of Aging*, 69, 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.NEUROBIOLAGING.2018.05.010>
- Renaud, J., Bournival, J., Zottig, X., & Martinoli, M. G. (2014). Resveratrol Protects DAergic PC12 Cells from high glucose-induced oxidative stress and apoptosis: Effect on p53 and GRP75 localization. *Neurotoxicity Research*, 25(1). <https://doi.org/10.1007/s12640-013-9439-7>
- Requejo-Aguilar, R., & Bolaños, J. P. (2016). Mitochondrial control of cell bioenergetics in Parkinson's disease. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 100, pp. 123–137). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.012>
- Requejo-Aguilar, R., Lopez-Fabuel, I., Jimenez-Blasco, D., Fernandez, E., Almeida, A., & Bolaños, J. P. (2015). DJ1 represses glycolysis and cell proliferation by transcriptionally upregulating pink1. *The Biochemical Journal*, 467(2), 303. <https://doi.org/10.1042/BJ20141025>
- Rocha, K. M. A., Goulart, A. da S., Costa, M. T., Salgueiro, A. C. F., & Folmer, V. (2021). The role of type 2 Diabetes mellitus as a risk factor for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Research, Society and Development*, 10(1), e23410111673. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i1.11673>
- Saeedi, P., Petersohn, I., Salpea, P., Malanda, B., Karuranga, S., Unwin, N., Colagiuri, S., Guariguata, L., Motala, A. A., Ogurtsova, K., Shaw, J. E., Bright, D., & Williams, R. (2019). Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 157. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2019.107843>
- Salazar, C., Ruiz-Hincapie, P., & Ruiz, L. M. (2018). The Interplay among PINK1/PARKIN/Dj-1 Network during Mitochondrial Quality Control in Cancer Biology: Protein Interaction Analysis. *Cells*, 7(10), 1. – 26 of 26. <https://doi.org/10.3390/CELLS7100154>

- Sancesario, G., Giorgi, M., D'Angelo, V., Modica, A., Martorana, A., Morello, M., Bengtson, C. P., & Bernardi, G. (2004). Down-regulation of nitregric transmission in the rat striatum after chronic nigrostriatal deafferentation. *European Journal of Neuroscience*, *20*(4). <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03566.x>
- Sanz, F. J., Solana-Manrique, C., Muñoz-Soriano, V., Calap-Quintana, P., Moltó, M. D., & Paricio, N. (2017). Identification of potential therapeutic compounds for Parkinson's disease using *Drosophila* and human cell models. *Free Radical Biology and Medicine*, *108*, 683–691. <https://doi.org/10.1016/j.FREERADBIOMED.2017.04.364>
- Sanz, F. J., Solana-Manrique, C., Torres, J., Masiá, E., María, ·, Vicent, J., & Paricio, · Nuria. (2021). A High-Throughput Chemical Screen in DJ-1 β Mutant Flies Identifies Zaprinas as a Potential Parkinson's Disease Treatment. *Neurotherapeutics* *2021*, *1*, 1–14. <https://doi.org/10.1007/S13311-021-01134-2>
- Sayed, A. R., Mohamed, A. R., Hassan, W. S., & Elmasry, M. S. (2021). Comparative study of novel green UV-spectrophotometric platforms for simultaneous rapid analysis of flumethasone pivalate and clioquinol in their combined formulation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *47*(6). <https://doi.org/10.1080/03639045.2021.1908341>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, *25*(4).
- Schneditz, G., Elias, J. E., Pagano, E., Zaeem Cader, M., Saveljeva, S., Long, K., Mukhopadhyay, S., Arasteh, M., Lawley, T. D., Dougan, G., Bassett, A., Karlsen, T. H., Kaser, A., & Kaneider, N. C. (2019). GPR35 promotes glycolysis, proliferation, and oncogenic signaling by engaging with the sodium potassium pump. *Science Signaling*, *12*(562), 9048. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aau9048>
- Sgobio, C., Sun, L., Ding, J., Herms, J., Lovinger, D. M., & Cai, H. (2019). Unbalanced calcium channel activity underlies selective vulnerability of nigrostriatal dopaminergic terminals in Parkinsonian mice. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41091-7>
- Shadrina, M., & Slominsky, P. (2021). Modeling Parkinson's Disease: Not Only Rodents? In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 13). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.695718>
- Shahnawaz, M., Mukherjee, A., Pritzkow, S., Mendez, N., Rabadia, P., Liu, X., Hu, B., Schmeichel, A., Singer, W., Wu, G., Tsai, A. L., Shirani, H., Nilsson, K. P. R., Low, P.

- A., & Soto, C. (2020). Discriminating α -synuclein strains in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Nature*, *578*(7794), 273–277. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1984-7>
- Sharma, T., Kaur, D., Grewal, A. K., & Singh, T. G. (2021). Therapies modulating insulin resistance in Parkinson's disease: A cross talk. In *Neuroscience Letters* (Vol. 749). <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135754>
- Sharma, V., Bedi, O., Gupta, M., & Deshmukh, R. (2022). A review: traditional herbs and remedies impacting pathogenesis of Parkinson's disease. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1007/S00210-022-02223-5>
- Sharmin, O., Abir, A. H., Potoi, A., Alam, M., Banik, J., Rahman, A. F. M. T., Tarannum, N., Wadud, R., Habib, Z. F., & Rahman, M. (2020). Activation of GPR35 protects against cerebral ischemia by recruiting monocyte-derived macrophages. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66417-8>
- Sheref, A. A., Naguib, Y. M., Abou-Elnour, E. S., Salem, H. R., Hassan, M. H., & Abdel-Razek, H. A. (2021). Neuroprotective Effect of Piracetam and Vincamine in a Rat Model of Haloperidol-induced Parkinson's Disease. *Bull. Egypt. Soc. Physiol. Sci*, *42*, 11–26.
- Shukla, A. K., Ratnasekhar, C., Pragya, P., Chaouhan, H. S., Patel, D. K., Chowdhuri, D. K., & Mudiam, M. K. R. (2016). Metabolomic Analysis Provides Insights on Paraquat-Induced Parkinson-Like Symptoms in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Neurobiology*, *53*(1), 254–269. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9003-3>
- Siddikuzzaman, & Grace, V. M. B. (2013). Antioxidant potential of all-trans retinoic acid (ATRA) and enhanced activity of liposome encapsulated ATRA against inflammation and tumor-directed angiogenesis. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, *35*(1). <https://doi.org/10.3109/08923973.2012.736520>
- Smits, L. M., Reinhardt, L., Reinhardt, P., Glatza, M., Monzel, A. S., Stanslowsky, N., Rosato-Siri, M. D., Zanon, A., Antony, P. M., Bellmann, J., Nicklas, S. M., Hemmer, K., Qing, X., Berger, E., Kalmbach, N., Ehrlich, M., Bolognin, S., Hicks, A. A., Wegner, F., ... Schwamborn, J. C. (2019). Modeling Parkinson's disease in midbrain-like organoids. *Npj Parkinson's Disease*, *5*(1). <https://doi.org/10.1038/s41531-019-0078-4>
- Solana-Manrique, C., Moltó, M. D., Calap-Quintana, P., Sanz, F. J., Llorens, J. V., & Paricio, N. (2019). *Drosophila* as a model system for the identification of pharmacological therapies in neurodegenerative diseases. In *Insights into Human Neurodegeneration: Lessons Learnt from Drosophila* (pp. 433–467). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2218-1_15

- Solana-Manrique, C., Muñoz-Soriano, V., Sanz, F. J., & Paricio, N. (2021). Oxidative modification impairs SERCA activity in *Drosophila* and human cell models of Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1867(7), 166152. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2021.166152>
- Solana-Manrique, C., Sanz, F. J., Ripollés, E., Bañó, M. C., Torres, J., Muñoz-Soriano, V., & Paricio, N. (2020). Enhanced activity of glycolytic enzymes in *Drosophila* and human cell models of Parkinson's disease based on DJ-1 deficiency. *Free Radical Biology and Medicine*, 158, 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.06.036>
- Solana-Manrique, C., Sanz, F. J., Torregrosa, I., Palomino-Schätzlein, M., Hernández-Oliver, C., Pineda-Lucena, A., & Paricio, N. (2022). Metabolic Alterations in a *Drosophila* Model of Parkinson's Disease Based on DJ-1 Deficiency. *Cells* 2022, Vol. 11, Page 331, 11(3), 331. <https://doi.org/10.3390/CELLS11030331>
- Solís, O., Espadas, I., Del-Bel, E. A., & Moratalla, R. (2015). Nitric oxide synthase inhibition decreases l-DOPA-induced dyskinesia and the expression of striatal molecular markers in Pitx3^{-/-} aphakia mice. *Neurobiology of Disease*, 73, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.09.010>
- Sorriento, D., Rusciano, M. R., Visco, V., Fiordelisi, A., Cerasuolo, F. A., Poggio, P., Ciccarelli, M., & Iaccarino, G. (2021). The metabolic role of grk2 in insulin resistance and associated conditions. In *Cells* (Vol. 10, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/cells10010167>
- Standl, E., Khunti, K., Hansen, T. B., & Schnell, O. (2019). The global epidemics of diabetes in the 21st century: Current situation and perspectives. *European Journal of Preventive Cardiology*, 26(2_suppl), 7–14. <https://doi.org/10.1177/2047487319881021>
- Stoker, T. B., & Barker, R. A. (2020). Recent developments in the treatment of Parkinson's Disease. In *F1000Research* (Vol. 9). F1000 Research Ltd. <https://doi.org/10.12688/f1000research.25634.1>
- Stoker, T. B., Torsney, K. M., & Barker, R. A. (2018). Emerging treatment approaches for Parkinson's disease. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 12, Issue OCT, p. 693). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00693>
- Stott, S. R. W., Wyse, R. K., & Brundin, P. (2021). Drug Repurposing for Parkinson's Disease: The International Linked Clinical Trials experience. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 15). <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.653377>
- Subramaniam, S. R., & Federoff, H. J. (2017). Targeting microglial activation states as a Therapeutic Avenue in Parkinson's disease. In *Frontiers in Aging Neuroscience* (Vol. 9, Issue JUN). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00176>

- Surmeier, D. J., Schumacker, P. T., Guzman, J. D., Ilijic, E., Yang, B., & Zampese, E. (2017). Calcium and Parkinson's disease. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 483, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.168>
- Surwit, R. S., Kuhn, C. M., Cochrane, C., McCubbin, J. A., & Feinglos, M. N. (1988). Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*, 37(9). <https://doi.org/10.2337/diab.37.9.1163>
- Suvarna, V. (2010). Phase IV of Drug Development. *Perspectives in Clinical Research*, 1(2).
- Świdarska, E., Strycharz, J., Wróblewski, A., Szemraj, J., Drzewoski, J., & Śliwińska, A. (2020). Role of PI3K/AKT Pathway in Insulin-Mediated Glucose Uptake. In *Blood Glucose Levels*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80402>
- Taniguchi, Y., Tonai-Kachi, H., & Shinjo, K. (2006). Zaprinast, a well-known cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase inhibitor, is an agonist for GPR35. *FEBS Letters*, 580(21), 5003–5008. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.015>
- Tan, S. Y., Mei Wong, J. L., Sim, Y. J., Wong, S. S., Mohamed Elhassan, S. A., Tan, S. H., Ling Lim, G. P., Rong Tay, N. W., Annan, N. C., Bhattamisra, S. K., & Candasamy, M. (2019). Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. In *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* (Vol. 13, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.10.008>
- Teleman, A. A., Ratzenböck, I., & Oldham, S. (2012). Drosophila: A Model for Understanding Obesity and Diabetic Complications. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 120(04), 184–185. <https://doi.org/10.1055/S-0032-1304566>
- Teslaa, T., & Teitell, M. A. (2014). Techniques to monitor glycolysis. In *Methods in Enzymology* (Vol. 542, pp. 91–114). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416618-9.00005-4>
- The Human Protein Atlas*. <https://www.proteinatlas.org/>
- Tolosa, E., Garrido, A., Scholz, S. W., & Poewe, W. (2021). Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 20(5), 385–397. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00030-2/ATTACHMENT/7A008994-39AA-4050-8DD6-B3A3C9DF0571/MMC1.PDF](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00030-2/ATTACHMENT/7A008994-39AA-4050-8DD6-B3A3C9DF0571/MMC1.PDF)
- Tomishima, M., & Kirkeby, A. (2021). Bringing Advanced Therapies for Parkinson's Disease to the Clinic: The Scientist's Perspective. In *Journal of Parkinson's Disease* (Vol. 11, Issue s2). <https://doi.org/10.3233/jpd-212685>

- Tozzi, A., Costa, C., Siliquini, S., Tantucci, M., Picconi, B., Kurz, A., Gispert, S., Auburger, G., & Calabresi, P. (2012). Mechanisms underlying altered striatal synaptic plasticity in old A53T- α synuclein overexpressing mice. *Neurobiology of Aging*, 33(8), 1792–1799. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.05.002>
- Trempe, J. F., & Fon, E. A. (2013). Structure and Function of Parkin, PINK1, and DJ-1, the Three Musketeers of Neuroprotection. *Frontiers in Neurology*, 4. <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2013.00038>
- Vacca, V. M. (2019). Parkinson disease. *Nursing*, 49(11), 24–32. <https://doi.org/10.1097/01.NURSE.0000585896.59743.21>
- Vázquez-Vélez, G. E., Zoghbi, H. Y., & Duncan, D. (2021). *Annual Review of Neuroscience Parkinson's Disease Genetics and Pathophysiology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-100720>
- Venkatesan, D., Iyer, M., Narayanasamy, A., Siva, K., & Vellingiri, B. (2020). Kynurenine pathway in Parkinson's disease—An update. In *eNeurologicalSci* (Vol. 21, p. 100270). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ensci.2020.100270>
- Vijjaratnam, N., Simuni, T., Bandmann, O., Morris, H. R., & Foltynie, T. (2021). Progress towards therapies for disease modification in Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 20(7), 559–572. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00061-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00061-2)
- Vos, M., & Klein, C. (2021). The importance of drosophila melanogaster research to uncover cellular pathways underlying parkinson's disease. In *Cells* (Vol. 10, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/cells10030579>
- Wakabayashi, K., Tanji, K., Odagiri, S., Miki, Y., Mori, F., & Takahashi, H. (2012). The Lewy Body in Parkinson's Disease and Related Neurodegenerative Disorders. *Molecular Neurobiology* 2012 47:2, 47(2), 495–508. <https://doi.org/10.1007/S12035-012-8280-Y>
- Wang, Z., Lin, Y., Liu, W., Kuang, P., Lao, W., Ji, Y., & Zhu, H. (2019). Voltage-Gated Sodium Channels Are Involved in Cognitive Impairments in Parkinson's Disease-like Rats. *Neuroscience*, 418, 231–243. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.024>
- Wu, R., Liu, X., Sun, J., Chen, H., Ma, J., Dong, M., Peng, S., Wang, J., Ding, J., Li, D., Speakman, J. R., Ning, G., Jin, W., & Yuan, Z. (2017). DJ-1 maintains energy and glucose homeostasis by regulating the function of brown adipose tissue. *Cell Discovery*, 3, 16054. <https://doi.org/10.1038/CELLDISC.2016.54>
- Xicoy, H., Wieringa, B., & Martens, G. J. M. (2017). The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. In *Molecular*

Neurodegeneration (Vol. 12, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0149-0>

- Xiong, H., Wang, D., Chen, L., Yeun, S. C., Ma, H., Tang, C., Xia, K., Jiang, W., Ronai, Z., Zhuang, X., & Zhang, Z. (2009). Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *Journal of Clinical Investigation*, *119*(3). <https://doi.org/10.1172/JCI37617>
- Yang, J., Kim, M. J., Yoon, W., Kim, E. Y., Kim, H., Lee, Y., Min, B., Kang, K. S., Son, J. H., Park, H. T., Chung, J., & Koh, H. (2017). Isocitrate protects DJ-1 null dopaminergic cells from oxidative stress through NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase (IDH). *PLOS Genetics*, *13*(8), e1006975. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1006975>
- Yasugi, T., Yamada, T., & Nishimura, T. (2017). Adaptation to dietary conditions by trehalose metabolism in *Drosophila*. *Scientific Reports*, *7*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-01754-9>
- Yin, L.-H., Shen, H., Diaz-Ruiz, O., Bäckman, C. M., Bae, E., Yu, S.-J., & Wang, Y. (2012). *Early post-treatment with 9-cis retinoic acid reduces neurodegeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/13/120>
- Zaitone, S. A., Abo-Elmatty, D. M., & Elshazly, S. M. (2012). Piracetam and vinpocetine ameliorate rotenone-induced Parkinsonism in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, *44*(6). <https://doi.org/10.4103/0253-7613.103300>
- Zhang, H., Liu, J., Li, C. R., Momen, B., Kohanski, R. A., & Pick, L. (2009). Deletion of *Drosophila* insulin-like peptides causes growth defects and metabolic abnormalities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(46), 19617–19622. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905083106>
- Zhang, J., Wang, Q., Zhu, N., Yu, M., Shen, B., Xiang, J., & Lin, A. (2008). Cyclic AMP inhibits JNK activation by CREB-mediated induction of c-FLIPL and MKP-1, thereby antagonizing UV-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, *15*(10), 1654–1662. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.87>
- Zhang, L., Wang, J., Wang, J., Yang, B., He, Q., & Weng, Q. (2020). Role of DJ-1 in Immune and Inflammatory Diseases. *Frontiers in Immunology*, *11*, 994. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00994/BIBTEX>
- Zhang, X. L., Wang, Z. Z., Shao, Q. H., Zhang, Z., Li, L., Guo, Z. Y., Sun, H. M., Zhang, Y., & Chen, N. H. (2019). RNAi-mediated knockdown of DJ-1 leads to mitochondrial dysfunction via Akt/GSK-3 β and JNK signaling pathways in dopaminergic neuron-like cells. *Brain Research Bulletin*, *146*, 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.01.007>

- Zhang, Y., Zhao, H., Liu, B., Shu, H., Zhang, L., Bao, M., Yi, W., Tan, Y., Ji, X., Zhang, C., Zhao, N., Pang, G., He, D., Wang, Y., Li, L., Yi, J., & Lu, C. (2021). Human serum metabolomic analysis reveals progression for high blood pressure in type 2 diabetes mellitus. *BMJ Open Diabetes Research and Care*, 9(1). <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2021-002337>
- Zhu, L., Bi, W., Lu, D., Zhang, C., Shu, X., & Lu, D. (2014). Luteolin inhibits SH-SY5Y cell apoptosis through suppression of the nuclear transcription factor- κ B, mitogen-activated protein kinase and protein kinase B pathways in lipopolysaccharide-stimulated cocultured BV2 cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7(5). <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1564>
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. In *Physiological Reviews* (Vol. 94, Issue 3). <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013>


ANEXO

Los resultados obtenidos durante esta tesis han permitido la publicación de los siguientes artículos:

- Sanz FJ, Solana-Manrique C, Torres J, Masiá E, Vicent MJ, Paricio N. A High-Throughput Chemical Screen in DJ-1 β Mutant Flies Identifies Zaprinas as a Potential Parkinson's Disease Treatment. *Neurotherapeutics*. 2021;18(4):2565-2578. doi:10.1007/s13311-021-01134-2
- Sanz FJ, Solana-Manrique C, Lilao-Garzón J, Brito-Casillas Y, Muñoz-Descalzo S, Paricio N. Exploring the link between Parkinson's disease and type 2 diabetes mellitus in *Drosophila*. *FASEB J*. 2022;36(8):e22432. doi:10.1096/fj.202200286R



A High-Throughput Chemical Screen in *DJ-1* β Mutant Flies Identifies Zaprinst as a Potential Parkinson's Disease Treatment

Francisco José Sanz^{1,2} · Cristina Solana-Manrique^{1,2} · Josema Torres³ · Esther Masiá⁴ · María J. Vicent⁴ · Nuria Paricio^{1,2} 

Accepted: 27 September 2021 / Published online: 25 October 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

Dopamine replacement represents the standard therapy for Parkinson's disease (PD), a common, chronic, and incurable neurological disorder; however, this approach only treats the symptoms of this devastating disease. In the search for novel disease-modifying therapies that target other relevant molecular and cellular mechanisms, *Drosophila* has emerged as a valuable tool to study neurodegenerative diseases due to the presence of a complex central nervous system, the blood–brain barrier, and a similar neurotransmitter profile to humans. Human PD-related genes also display conservation in flies; *DJ-1* β is the fly ortholog of *DJ-1*, a gene for which mutations prompt early-onset recessive PD. Interestingly, flies mutant for *DJ-1* β exhibit PD-related phenotypes, including motor defects, high oxidative stress (OS) levels and metabolic alterations. To identify novel therapies for PD, we performed an in vivo high-throughput screening assay using *DJ-1* β mutant flies and compounds from the Prestwick® chemical library. Drugs that improved motor performance in *DJ-1* β mutant flies were validated in *DJ-1*-deficient human neural-like cells, revealing that zaprinast displayed the most significant ability to suppress OS-induced cell death. Zaprinast inhibits phosphodiesterases and activates GPR35, an orphan G-protein-coupled receptor not previously associated with PD. We found that zaprinast exerts its beneficial effect in both fly and human PD models through several disease-modifying mechanisms, including reduced OS levels, attenuated apoptosis, increased mitochondrial viability, and enhanced glycolysis. Therefore, our results support zaprinast as a potential therapeutic for PD in future clinical trials.

Keywords *Drosophila* · Parkinson's disease · Zaprinast · High-throughput screening · Phosphodiesterase inhibitor · GPR35 agonist

Introduction

Parkinson's disease (PD), a progressive neurodegenerative movement disorder [1], is characterized by resting tremor, muscular rigidity, bradykinesia postural instability, and other

non-motor symptoms that worsen patients' quality of life [2]. The appearance of these symptoms is caused by the selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta, which leads to a reduction in dopamine levels in the striatum [3], and the formation of intracellular protein aggregates called Lewy bodies in neurons [4]. Additional factors associated with PD progression include elevated oxidative stress (OS) levels, mitochondrial dysfunction, and metabolic alterations [5, 6]. Striatal dopamine replacement using dopamine precursors, dopamine agonists, or inhibitors of dopamine metabolism [7] currently represents the most commonly employed treatment for PD; however, this therapeutic approach only treats symptoms during early-stage disease and does not modify the underlying disease in the long term. Furthermore, the efficacy of this treatment strategy decreases after long-term administration, and it cannot counteract or delay PD progression. Therefore, we require novel therapies that target other disease-related

✉ Nuria Paricio
nuria.paricio@uv.es

¹ Departamento de Genética, Facultad CC Biológicas, Universidad de Valencia, 46100 Burjassot, Spain

² Instituto Universitario de Biotecnología Y Biomedicina (BIOTECMED), Universidad de Valencia, 46100 Burjassot, Spain

³ Departamento de Biología Celular, Biología Funcional Y Antropología Física, Facultad CC Biológicas, Universidad de Valencia, 46100 Burjassot, Spain

⁴ Polymer Therapeutics Lab and Screening Platform, Centro de Investigación Príncipe Felipe, 46012 Valencia, Spain

molecular and cellular mechanisms in the hope of modifying the underlying disease [8, 9]. In this sense, multiple studies have evaluated compounds whose mechanisms of action may impact calcium transport, OS levels, mitochondrial function, autophagy, or energy metabolism as potential PD treatments [7, 10, 11]. Notably, the current PD drug development pipeline, based on ongoing clinical trials, involves therapeutics that treat both symptoms and the underlying disease [12].

Although most PD cases are sporadic and involve the contribution of environmental factors and aging, there also exist familial cases caused by mutations in specific genes [13]. Studies have identified clear links between sporadic and familial PD cases, which are clinically and pathologically indistinguishable except for age at onset [14]. Functional studies of genes involved in familial PD have led to a better understanding of the mechanisms and molecular pathways underlying PD pathophysiology that may govern/influence progressive neurodegeneration [15–17]. Mutations in one such gene, *DJ-1* (also known as *PARK7*), associate with an early-onset recessive form of Parkinsonism [18]. *DJ-1* was initially described as an oncogene, but additional functions for the DJ-1 protein include roles as an antioxidant via free-radical scavenging, a transcriptional regulator of antioxidant genes, a redox-dependent molecular chaperone, a modulator of mitochondrial function, a deglycase, and as a factor involved in proteolysis and metabolism [19–22]. Also, a study encountered an over-oxidized and inactive form of the DJ-1 protein in brains of sporadic PD patients [23], strongly suggesting that results obtained in animal and cell models of familial PD based on loss of *DJ-1* function may also have relevance to the sporadic form of the disease [24].

Drosophila has recently emerged as an essential tool in the study of neurodegenerative diseases due to the presence of a complex central nervous system (CNS), a blood–brain barrier (BBB), and similar neurotransmitters to humans [25–27]. Furthermore, more than 70% of human disease-related genes display conservation in flies [28], including orthologs of genes involved in familial PD cases (e.g., *DJ-1*, *PINK1*, *PRKN*, or *LRRK2*) [29]. Flies harboring mutations in such genes exhibit PD-related phenotypes and have allowed the identification of potentially pathogenic mechanisms and modifiers of PD pathology through genetic or pharmacological approaches [30]. Our previous studies revealed that flies carrying mutations in *DJ-1 β* (*Drosophila* ortholog of the human *DJ-1* gene) exhibited shortened lifespans, motor defects, high OS levels, and hypersensitivity to OS-inducing toxins [31, 32]. Interestingly, we also discovered that supplementation with antioxidant compounds efficiently suppressed some of these phenotypes, thereby confirming *Drosophila* as an amenable model organism to identify and validate new drugs with therapeutic potential in PD patients [31–33]. Supporting this assumption, we subsequently performed a pilot screen to evaluate the effect of

antioxidant, anti-inflammatory, and neuroprotective compounds in *DJ-1 β* mutant flies. Excitingly, selected compounds that attenuated motor defects associated with loss of *DJ-1 β* function also increased the viability of *DJ-1*-deficient human neuroblastoma cells subjected to OS conditions [34], thereby supporting the translatability of pharmacological studies carried out in *Drosophila*. The conservation of the BBB in flies increases the probability of encountering novel and relevant therapeutic compounds to treat PD and other human diseases [27, 35].

The present study aimed to identify drugs as novel treatment options for PD through an in vivo high-throughput screening (HTS) assay in a *Drosophila* PD model (*DJ-1 β* inactivating mutation) using compounds from the Prestwick® Chemical Library (PCL). We identified drugs that attenuated motor defects in *DJ-1 β* mutant flies and then further evaluated the potential neuroprotective effect of candidates in *DJ-1*-deficient human neuron-like cells. Among the compounds identified, zaprinast (ZAP) treatment displayed the most significant reduction in OS-induced cell death. We found that ZAP suppressed multiple disease phenotypes in fly and human cell PD models based on *DJ-1* deficiency, and exhibited disease-relevant mechanisms of action. Thus, ZAP covers various aspects of translational cross-species and multi-phenotype modeling, as recommended to improve drug discovery in neurodegenerative diseases [36]. Taken together, our results support ZAP as a potentially interesting therapy for PD that could exert beneficial effects in future clinical trials.

Material and Methods

Drosophila Stocks

Fly stocks employed in this study were the *DJ-1 β ^{ex54}* strain (referred to as *DJ-1 β*) from the J. Chung laboratory [37] and the *park²⁵* strain (referred to as *park*) from the A. J. Whitworth laboratory [38]. Stocks and fly crosses were cultured using standard *Drosophila* feed at 25 °C unless otherwise indicated.

Drug Treatment and Climbing Assays

The effect of the 1120 compounds from the PCL, which are dissolved in 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) at a final concentration of 5 mM, on the locomotor ability of *DJ-1 β* mutant flies was evaluated. To do this, 40 L2 stage larvae were cultured in tubes (100 × 16 mm, SARSTEDT) with 1 ml of standard food containing 0.2% DMSO or supplemented with each compound at a final concentration of 10 μ M. After eclosion, adult male and female flies were

transferred to new tubes, and a climbing assay performed five days later using a protocol adapted from a previous study [34]. Briefly, flies were divided into 2–4 groups, depending on the amount of individuals hatching in that period. Subsequently, each group of flies was transferred to graduated plastic tubes, acclimated for 1 min, gently tapped down to the tube bottom, and allowed to climb for 10 s. This process was recorded and repeated four times for each group of flies. Climbing ability was determined as the average of the height reached by each group of flies. Compounds that improved locomotor activity of flies with a *P* value below 0.05 were selected as positive candidates. All drugs were screened blindly. For further experiments, a new batch of zaprinast was obtained (Santa Cruz Biotechnology) and a 100 mM stock dissolved in DMSO was prepared.

We used a protocol adapted from a previous study for climbing assays in *park* mutants [38]. Briefly, 5 tubes (75 × 23.5 mm, SARSTEDT) with 80 L2 stage larvae each were cultured with 2.5 ml of standard food containing 0.1% DMSO or supplemented with 10 μM zaprinast. After hatching, homozygous *park* male flies were transferred to new tubes, and a climbing assay was performed 3 to 4 days later. Briefly, groups of 10–15 flies were acclimated for 1 min in new vials, gently tapped down to the tube bottom, and allowed to climb. We counted the number of flies that crossed a line drawn at 7 cm from the vial's bottom in 10 s. This process was recorded and repeated three times for each group of flies.

Cell Culture and Drug Treatment

DJ-1-deficient and *pLKO.1* control SH-SY5Y neuron-like cells previously generated by our laboratory [34] were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% non-essential amino acids, and 100 mg/ml penicillin/streptomycin at 37 °C and 5% CO₂. All cell culture materials were purchased from Biowest. Viability of cells treated with candidate compounds, the GPR35 antagonist CID2745687 and DMSO as vehicle was evaluated using an MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, as previously described [22]. To determine whether CID2745687 was able to interfere with the neuroprotective effect of zaprinast, cells were pretreated for 2 h with different concentrations of the compound before the addition of zaprinast. Next, viability assays were carried out as described [22]

Quantification of Protein Carbonyl Group Formation and H₂O₂ Levels

Protein carbonylation and H₂O₂ levels were measured in 5-day-old *DJ-1* mutant flies that were treated with the

vehicle (0.1% DMSO) as control or treated with 10 μM zaprinast. Protein carbonyl groups were measured in fly extracts using 2,4-dinitrophenyl hydrazine derivatization in 96-well plates (Greiner 96-well plate, polypropylene) as previously described [22]. H₂O₂ levels were measured using the Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Invitrogen) in fly extracts as previously described [34]. All experiments were carried out using three biological replicates and three technical replicates for each sample.

Western Blotting

Protein extraction and Western blots of *pLKO.1* and *DJ-1*-deficient SH-SY5Y cells treated with 1 μM zaprinast and vehicle (0.1% DMSO) under OS conditions were carried out as previously described [22]. The primary antibodies used were anti-Akt, anti-phospho-Akt (Ser473), anti-JNK, and anti-phospho-JNK (Thr183/Tyr185) (1:1000, Cell Signaling). Secondary antibodies used were anti-rabbit or anti-mouse HRP-conjugated (1:5000, Sigma). Quantifications of protein levels were performed with an ImageQuant™ LAS 4000mini Biomolecular Imager (GE Healthcare), and images were analyzed with ImageJ software (NIH).

Mitochondrial Viability

Mitochondrial viability assays were performed using the MitoTracker™ Red FM (Invitrogen) fluorescence dye in *DJ-1*-deficient and control SH-SY5Y cells. Briefly, 50 × 10⁴ cells were seeded on glass coverslips in P60 cell culture dishes and incubated overnight. Next, the cell culture medium was removed, and fresh medium supplemented with 1 μM zaprinast or 0.1% DMSO was added and cells incubated for 24 h. Subsequently, the cell culture medium was removed, and cells were incubated in 60 nM Mitotracker™ Red FM diluted in incomplete cell culture medium for 30 min. Finally, cells were washed three times with PBS, and coverslips were mounted onto microscope slides with Vectashield (mounting medium) with DAPI (Vector Laboratories). Fluorescence images were acquired using fluorescence microscopy (Leica DMI3000 B) and analyzed with ImageJ software (NIH).

Enzymatic Assays

The enzymatic activities of enolase (Eno; EC 4.2.1.11), phosphofructokinase (Pfk; EC 2.7.1.11), pyruvate kinase (Pk; EC 2.7.1.40), and hexokinase (Hk; EC 2.7.1.1) were measured using coupled enzymatic assays in extracts of *pLKO.1* and *DJ-1*-deficient SH-SY5Y cells treated with 1 μM zaprinast or vehicle (0.1% DMSO) for 24 h as previously described [22]. All experiments were performed in triplicate.

Quantification of ATP Levels

ATP levels in SH-SY5Y cells were measured using the ATP Determination Kit (Invitrogen). One day prior to the assay, 10,000 *pLKO.1* or *DJ-1*-deficient cells were seeded in a white 96-well plate and incubated for 24 h with 1 μM zaprinast or with 0.1% DMSO as vehicle medium. Subsequently, they were incubated with 50 μM of H_2O_2 for 3 h, and later 100 μl of the ATP assay mix was added. Luminescence intensity was measured using an Infinite 200 PRO reader (Tecan). An MTT assay was also performed in order to calculate cell viability. All experiments were performed in triplicate and results are expressed as relative luminescence intensity per cell viability.

Statistical Analyses

The significance of differences between means was assessed using a *t*-test when two experimental groups were analyzed. In experiments in which more than two experimental groups were used, the statistical analysis was made using the ANOVA test and Tukey's post hoc test. Differences were considered significant when $P < 0.05$. Data are expressed as means \pm standard deviation (s.d.).

Results

A High-Throughput Chemical Screen in DJ-1 β Mutant Flies and Validation in DJ-1-Deficient Human Cells

HTS assays for drug discovery carried out in cell models do not account for anatomical integrated physiological factors that impact a drug's ability to interact with its target or modify the response to target engagement. Results obtained using in vivo preclinical models provide a much more unambiguous indication of the potential pharmacological effects of a drug in humans [39, 40]. To identify novel treatments for PD, we performed an in vivo HTS assay using a *Drosophila* PD model (*DJ-1 β* inactivation) and compounds from the PCL library, which are dissolved in 100% DMSO at a final concentration of 5 mM. The assay's rationale was that drugs able to suppress the motor deficits observed in *DJ-1 β* mutant flies, a phenotype resembling a classic PD symptom [2], may also display benefits when tested in *DJ-1*-deficient cells [34]. Figure 1a provides an overview of the screening strategy used in this study.

First, we evaluated the effect of the 1120 PCL drugs on the locomotor ability of *DJ-1 β* mutants by culturing L2 larvae in media supplemented with each compound at a concentration of 10 μM during development and 5 days after fly eclosion, and climbing assays were performed at that

age (see "Material and Methods"). Among the drugs evaluated, 138 significantly improved the locomotor performance of *DJ-1 β* mutant flies (Fig. 1a, b). We then evaluated the ability of these compounds to reduce OS-induced death in *DJ-1*-deficient SH-SY5Y cells [34]. We discovered that 19 of the 138 compounds identified in the screen performed in PD model flies displayed neuroprotective effects in *DJ-1*-deficient cells (validation step, Fig. 1a). We discarded 5 molecules after an in-depth literature review of their properties and adverse reactions given the description of Parkinsonism or motor dysfunctions among side effects in humans (Fig. 1A). At this point, we retested 8 drugs from the PCL not identified to be beneficial for PD model flies in the primary screen but with a mechanism of action similar to the 14 remaining drugs in the final list of potential therapeutic compounds (hit-expansion step, Fig. 1a). Finally, we carried out a revalidation step with the 22 leads in *DJ-1*-deficient cells and selected 10 candidate compounds that exhibited clear beneficial effects in cell viability assays (Fig. 1a, c).

Encouragingly, this list included two compounds (clonidine and bumetanide) currently under evaluation in Phase II clinical trials in PD patients (NCT03552068 and NCT03899324, respectively), which supports the relevance of results obtained in the HTS assay. We also identified meclizine, an FDA-approved antiemetic drug recently shown to attenuate PD-related phenotypes in fly and human cell models based on *DJ-1* inactivation by increasing glycolysis [22]. Other compounds belonged to different chemical categories (such as phosphodiesterase (PDE) inhibitors or corticosteroids) prescribed for various therapeutic indications (anti-hypertensive, anti-inflammatory, or antibiotic compounds). As zaprinast (ZAP) reduced OS-induced death in *DJ-1* mutant cells by the most significant degree (Fig. 1c), we selected this compound for further analyses. This drug is a phosphodiesterase (PDE) inhibitor, and can also activate the GPR35 orphan G-protein coupled receptor [41, 42]. Interestingly, it was previously reported that ZAP restores striatal long-term depression in mice transgenic for *A53T-SNCA* [43], and that it attenuated L-DOPA-induced dyskinesia in genetic and toxin-induced models of PD in mice and rats [44, 45] by inhibiting PDEs in both cases. Therefore, we assessed the effect of ZAP supplementation in our fly and human cell PD models to determine any disease-modifying potential.

Zaprinast Suppresses PD-Related Phenotypes in DJ-1 β and parkin Mutant Flies

The DJ-1 protein plays an essential role in the defense against OS through several pathways [46]. Accordingly, PD models based on *DJ-1*-deficiency present high OS levels [32, 33, 47], which are clearly associated with PD pathology [3]. We previously reported that *DJ-1 β* mutant flies exhibited increased

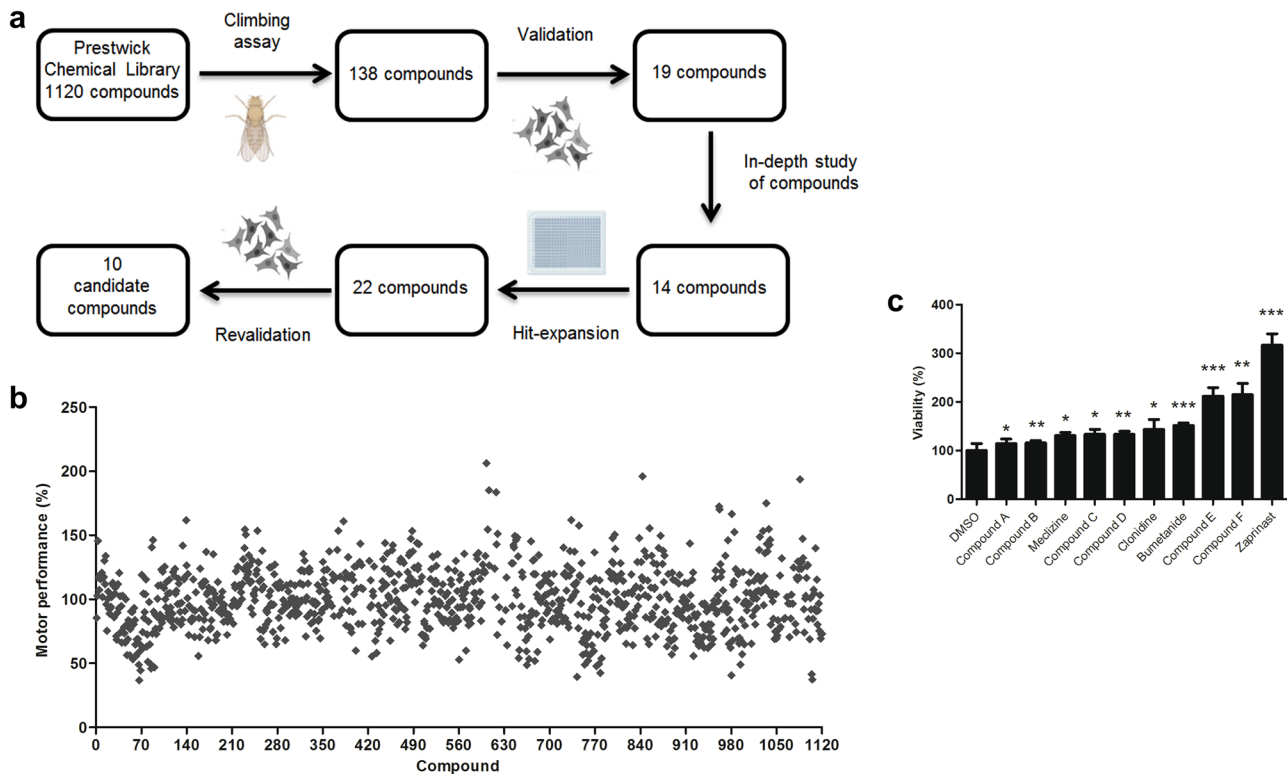


Fig. 1 A High-throughput chemical screen and drug validation. **a** Scheme of the screening procedure used in the current study. Each screening stage (depicted by an arrow) led to several positive-hit compounds taken to the next stage. **b** Motor performance of *DJ-1* mutant flies obtained during the primary HTS for the 1120 evaluated drugs analyzed by climbing assays. Results are normalized to data obtained in *DJ-1* mutants treated with vehicle (DMSO). See

“Material and Methods” section for details. **c** The viability of *DJ-1*-deficient cells was measured by MTT assays in the presence of OS (induced with 100 μM H_2O_2) and treated with the ten selected compounds. Results are normalized to data obtained in vehicle-treated *DJ-1*-deficient cells (DMSO). Error bars show s.d. from three independent biological replicates (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001)

levels of reactive oxygen species (ROS) and protein carbonylation (a consequence of high ROS levels) compared to control flies of the same age [32–34, 47]. Thus, we evaluated whether ZAP supplementation suppressed those phenotypes in *DJ-1* mutant flies. Our results revealed that *DJ-1* mutants treated with ZAP during development and 5 days after eclosion presented a mild but significant reduction in H_2O_2 production (a component of the total ROS pool) compared to flies treated with vehicle (Fig. 2a). Consistently, we also observed a significant reduction in protein carbonylation after ZAP supplementation (Fig. 2b). Therefore, ZAP treatment in PD model flies based on *DJ-1* deficiency was able to reduce OS levels, which have been shown to have a causative role in their motor deficits [34]. Of note, our preliminary results established that ZAP is also able to suppress motor defects in *park* mutant flies (Fig. 2c), another *Drosophila* model of familial PD [38]. Considering that no ortholog of human GPR35 does exist in the *Drosophila* genome, ZAP is probably exerting its beneficial effect in PD model flies through its PDE inhibitor activity. Indeed, *Drosophila* PDE1, PDE6, and PDE11 function were already shown to be sensitive to ZAP treatment [48]

Zaprinast Activates Akt Signaling and Downregulates the JNK Pathway in *DJ-1*-deficient human cells

We next determined any neuroprotective effect of ZAP in *DJ-1*-deficient cells (as shown in Fig. 1c). First, we evaluated the ability of ZAP exposure to protect against the OS-induced death of *DJ-1*-deficient human neuroblastoma cells in a dose-dependent manner by pretreating them with ZAP (0.1–80 μM) and measuring viability via MTT assays. Our results demonstrated that ZAP significantly attenuated cell death at low concentrations (between 0.1 and 10 μM), with 1 μM the most effective (Fig. 3a). As shown in Fig. S1, ZAP did not affect viability in control cells at those concentrations.

Apoptosis has been identified as an important mechanism that leads to neuronal death in PD [49]. This process is highly regulated by the activity of several kinases like the pro-survival factor Akt and the pro-apoptotic factor JNK [50]. Previous studies revealed that *DJ-1* knockdown in human neuroblastoma SH-SY5Y cells and rat adrenal pheochromocytoma PC12 cells decreased Akt phosphorylation,

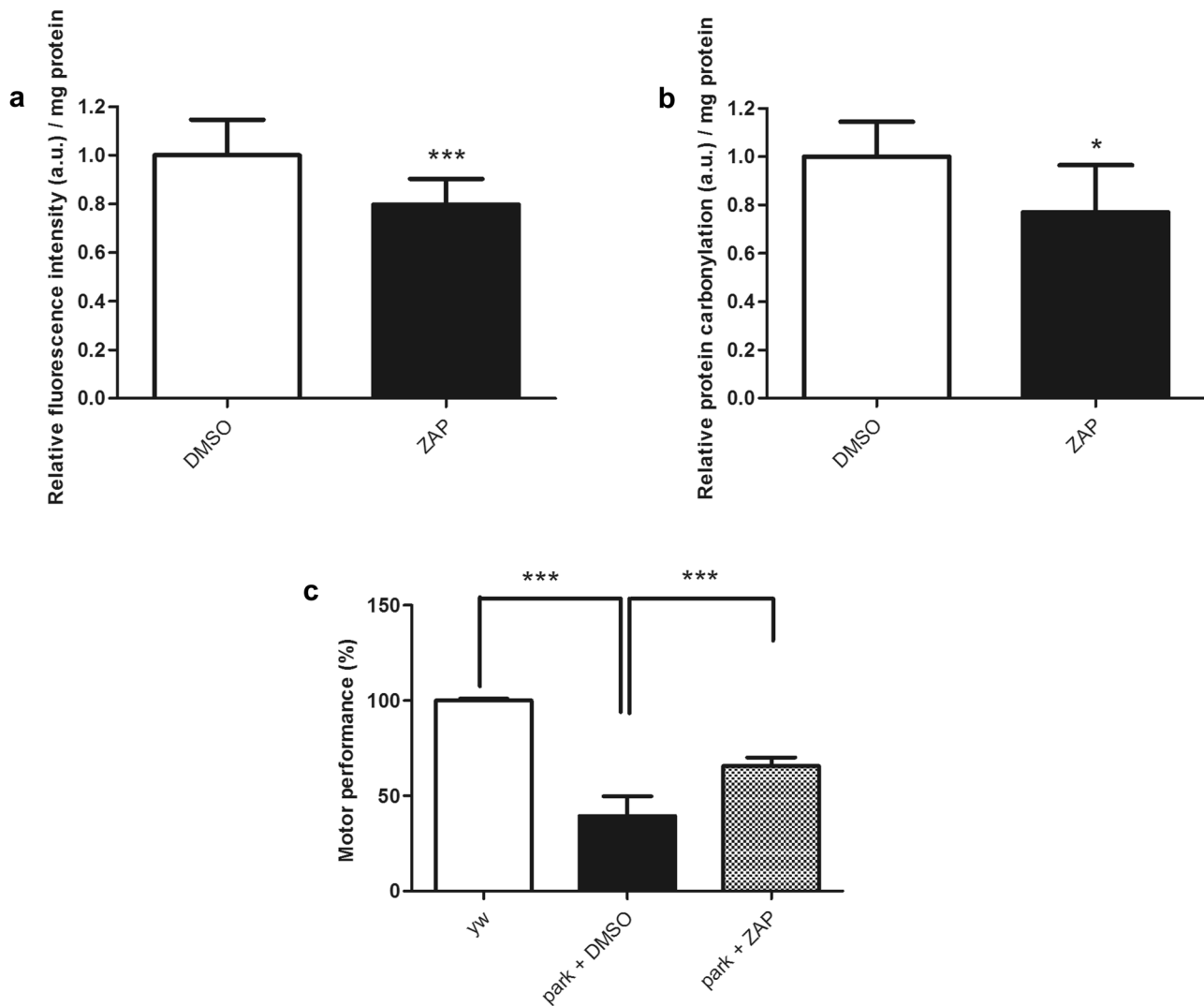


Fig. 2 Effect of zaprinast on PD model flies. **a** H_2O_2 levels in *DJ-1 β* mutant flies treated with $10\ \mu\text{M}$ ZAP were analyzed using the Amplex H_2O_2 Red Kit (Invitrogen). **b** Protein carbonylation levels in *DJ-1 β* mutants treated with $10\ \mu\text{M}$ ZAP were analyzed by absorbance. In all cases, data were expressed as arbitrary units (a.u.) per mg of protein, and results were referred to data obtained in flies cultured

in vehicle medium (DMSO). **c** Motor performance of *y,w* control flies and *park* mutant flies treated with vehicle (DMSO) or $1\ \mu\text{M}$ ZAP was evaluated performing a climbing assay. Error bars show s.d. from at least three replicates and three independent experiments (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$)

thus suppressing the Akt signaling pathway. Besides, it also increased JNK phosphorylation, thus overactivating JNK signaling pathway and promoting cell death [51, 52]. Analysis of Akt and JNK phosphorylation levels in our *DJ-1*-deficient cells confirmed the presence of similar molecular alterations (Fig. S2). Since ZAP showed a neuroprotective effect in *DJ-1*-deficient cells, we performed Western blot assays to determine whether pretreatments with $1\ \mu\text{M}$ ZAP affected Akt or JNK phosphorylation levels in such cells. Phosphorylation of Akt at Ser473 and total Akt levels were measured in mutant cells pretreated with ZAP. Our results showed that ZAP supplementation was able to significantly increase Akt phosphorylation (Fig. 3b), which leads to its

activation [51]. Besides, mutant cells pretreated with ZAP also displayed a significant reduction of JNK phosphorylation at Thr183 and Tyr185 (Fig. 3c), leading to its inactivation [51].

Taken together, these results support the neuroprotective effect of ZAP supplementation in *DJ-1*-deficient cells through the modification of Akt and JNK pathway activation. Previous studies reported that several PDE inhibitors exhibited anti-apoptotic properties through Akt pathway activation [53, 54]. Furthermore, neuroprotection mediated by pamoic acid, a potent GPR35 agonist, in stroke associates with an increase in Akt phosphorylation [55]; therefore, ZAP may exert its neuroprotective effect in PD model cells

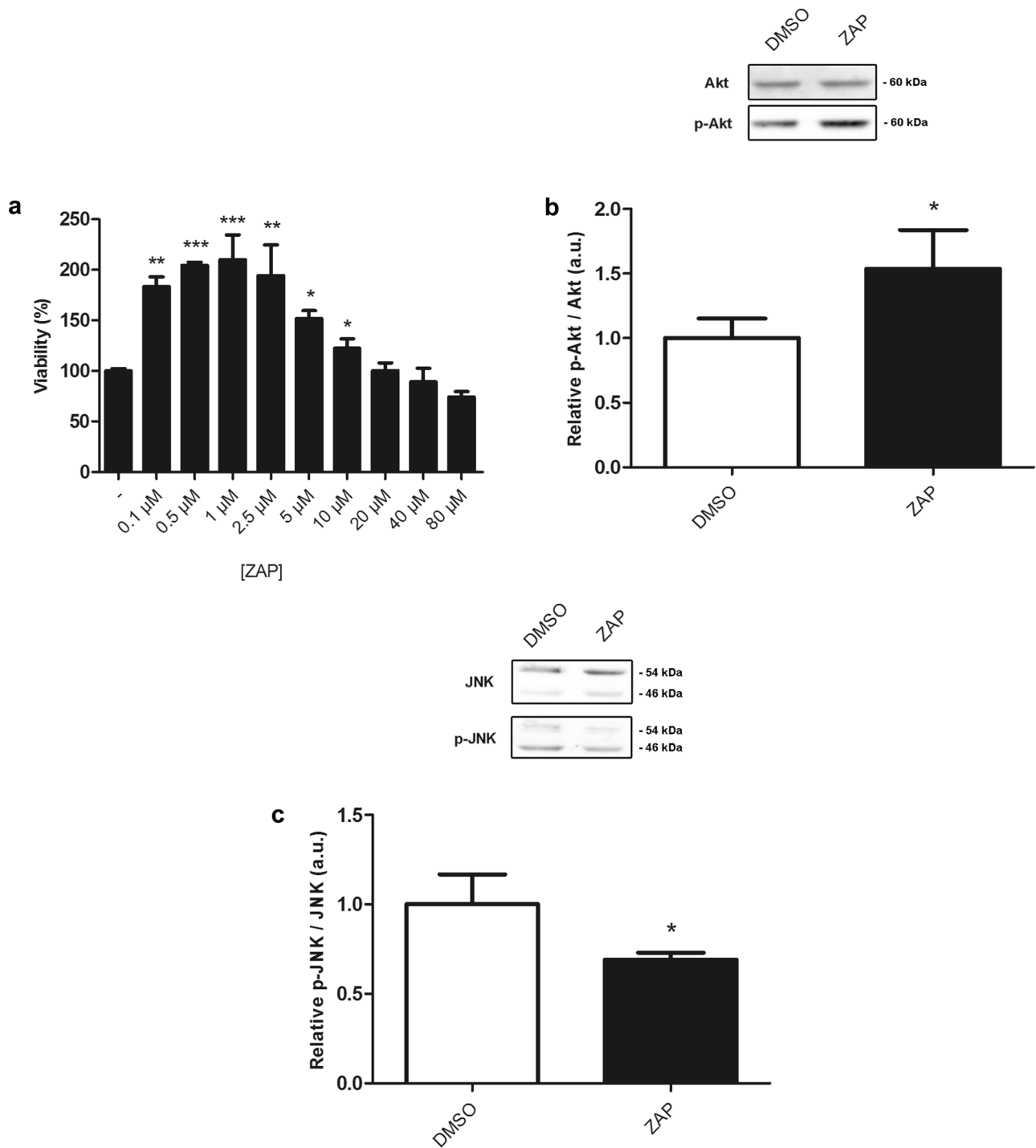


Fig. 3 Effect of zaprinast on viability and Akt/JNK pathway activities in *DJ-1*-deficient cells. **a** MTT assays measured the viability of *DJ-1*-deficient cells in the presence of OS (induced with 100 μ M H_2O_2). Cells were either treated with vehicle (DMSO) or with ZAP (0.1–80 μ M). Results were normalized to data obtained in vehicle-treated mutant cells (-). **b, c** Antibodies against Akt, p-Akt, JNK, and p-JNK were used to detect proteins of interest in *DJ-1*-deficient

cells subjected to OS and treated with 1 μ M ZAP by Western blot (upper panels). The relative ratios of p-Akt/Akt and p-JNK/JNK were analyzed by densitometry (lower panels). Results are referred to data obtained in vehicle-treated *DJ-1*-deficient cells and expressed as arbitrary units (a.u.). In all cases, error bars show s.d. from three independent experiments in which three biological replicates were used (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$)

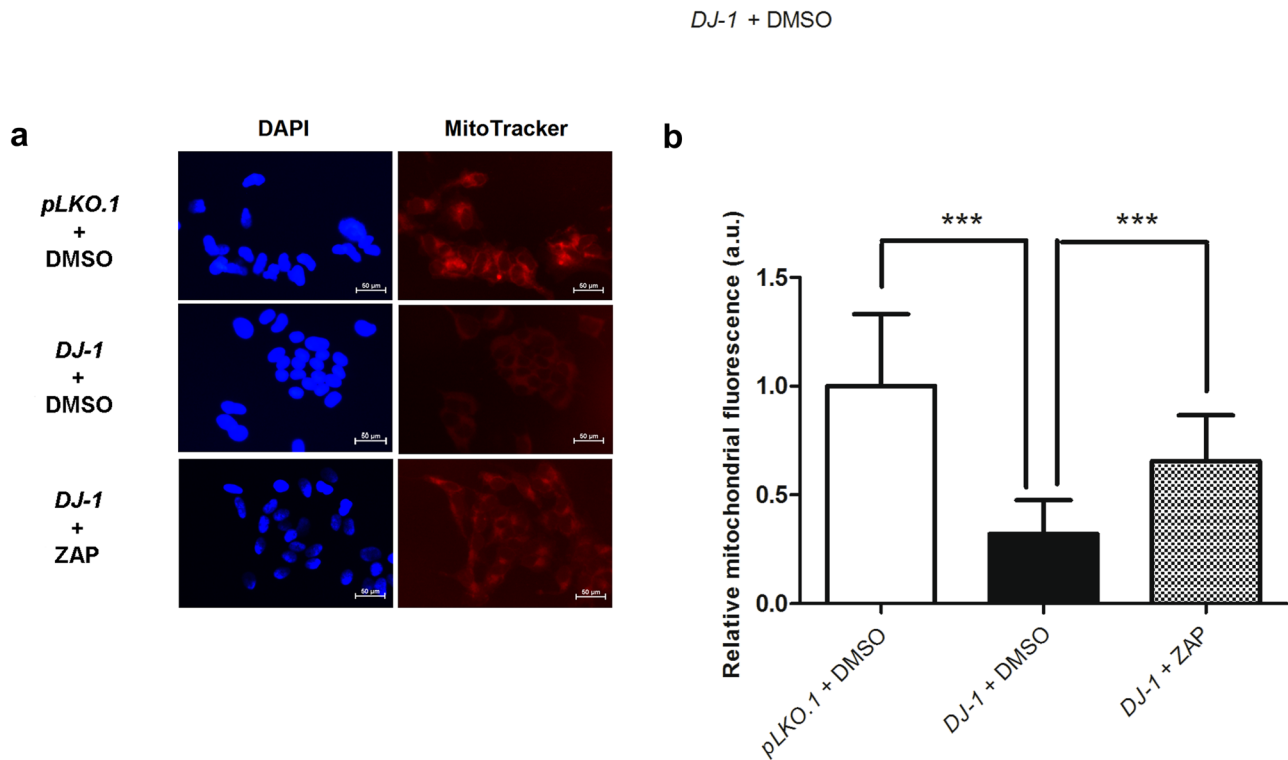


Fig. 4 Effect of zaprinast on mitochondrial activity in *DJ-1*-deficient cells. **a** Representative images of SH-SY5Y cells stained with MitoTracker Red FM, a specific mitochondrial dye, and the nuclear dye DAPI (blue) acquired via fluorescence microscopy. Cells stained were *pLKO.1* control cells and *DJ-1*-deficient cells pretreated with vehicle (DMSO), and *DJ-1*-deficient cells treated with 1 μ M ZAP. Scale bar,

50 μ m. **b** Graphical representation of Mitotracker Red FM fluorescence quantification from **a**. At least ten images of each strain and condition were analyzed. Results are normalized to data obtained in vehicle-treated *pLKO.1* control cells and expressed as arbitrary units (a.u.). Error bars show s.d. from three independent experiments in which three biological replicates were used (***) $P < 0.001$

based on *DJ-1* deficiency either by inhibiting PDEs or by activating GPR35.

Zaprinast Increases Mitochondrial Viability in *DJ-1*-Deficient Human Cells

Mitochondrial dysfunction has been related to PD pathogenesis [56]. Accordingly, previous studies have revealed that *DJ-1* knockdown decreases active mitochondrial mass and alters mitochondrial morphology and function [51, 57, 58]. Mitochondrial alterations in *DJ-1*-deficient cells could be associated with the inhibition of Akt pathway and with JNK activation [51, 59], which have both been proposed as novel therapeutic targets for PD [51]. As ZAP supplementation led to Akt activation and JNK inhibition (Fig. 3b, c), we hypothesized that these changes might improve mitochondrial viability. We discovered that *DJ-1* mutant cells displayed a significant decrease in the active mitochondrial mass compared to *pLKO.1* control cells using the MitoTracker™ Red FM dye, as evidenced by a reduction in fluorescence intensity (Fig. 4). As expected, pretreatment of *DJ-1*-deficient cells with ZAP resulted in a significant

increase in the number of viable mitochondria compared to vehicle-treated cells (Fig. 4), supporting the therapeutic potential of ZAP as a means to ameliorate PD-associated mitochondrial dysfunction.

Zaprinast Enhances the Activity of Key Glycolytic Enzymes in *DJ-1*-Deficient Human Cells

It has been recently shown that PD is also characterized by metabolic alterations [22, 60, 61]. In fact, lack of *DJ-1* leads to an enhancement of the glycolytic pathway, probably as a means to counteract the reduction of ATP levels caused by mitochondrial dysfunction [22, 62]. Despite this, it has been reported that primary midbrain cultures from *DJ-1* mice embryos still showed reduced ATP levels when compared to wild-type controls [63]. The glycolytic rate can be evaluated by measuring the activity of key enzymes involved in this pathway [64], and we recently reported that *DJ-1*-deficient cells presented higher activities of hexokinase (Hk), phosphofructokinase (Pfk), enolase (Eno), and pyruvate kinase (Pk) when compared to vehicle-treated cells [22]. Furthermore, several studies have demonstrated that enhancing glycolysis

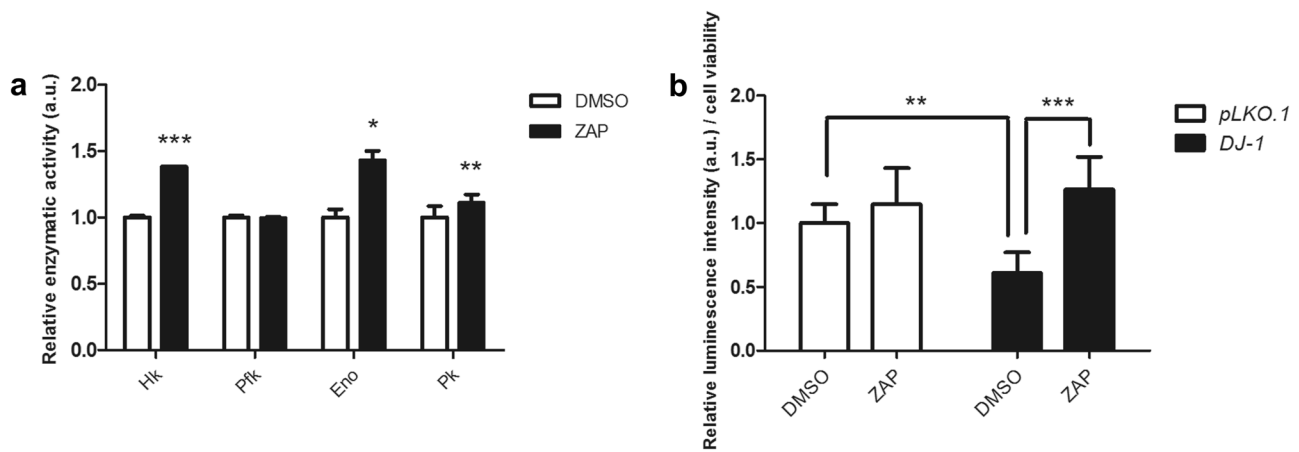


Fig. 5 Effect of zaprinast on the activity of glycolytic enzymes and on ATP levels in *DJ-1*-deficient cells. **a** The activity of hexokinase (Hk), phosphofructokinase (Pfk), enolase (Eno), and pyruvate kinase (Pk) in *DJ-1*-deficient cells treated with 1 μ M ZAP under OS condition induced with 50 μ M H_2O_2 . Results were normalized to data obtained in vehicle-treated cells (DMSO). In all cases, error bars show s.d. from three replicates and three independent experiments

(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). **b** ATP levels in *DJ-1*-deficient cells in the presence of OS (induced with 50 μ M H_2O_2) treated with vehicle (DMSO) or with 1 μ M ZAP were analyzed using the ATP Determination Kit (Invitrogen). Results were normalized to data obtained in vehicle-treated *pLKO.1* cells (DMSO). Error bars show s.d. from three independent experiments in which three biological replicates were used (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)

may represent a promising target for PD treatment [22, 65]. Therefore, we evaluated whether ZAP treatment affected glycolysis in *DJ-1*-deficient cells by quantifying the activity of these key glycolytic enzymes. Interestingly, our results demonstrated that ZAP supplementation led to a significant and robust increase in Hk and Eno activity, and to a mild increase of Pk activity in *DJ-1*-deficient cells (Fig. 5A). According to this, we found that this enhancement of glycolysis resulted in an increase in ATP levels in ZAP-treated *DJ-1* mutant cells compared to those treated with vehicle (Fig. 5b). These

results confirm our previous hypothesis that the increase in the glycolytic pathway is aimed to recover ATP levels [22] which are reduced in *DJ-1*-deficient cells when compared to controls (Fig. 5b). Our results also showed that ZAP treatment led to increase Eno and Pfk activities in control cells (Fig. S3), although no significant changes in ATP levels were found in such cells (Fig. 5b). Taken together, these results indicate that ZAP may contribute to enhance glycolysis and to restore ATP levels in PD model cells. A previous study had suggested that inhibition of cGMP PDE isoforms may

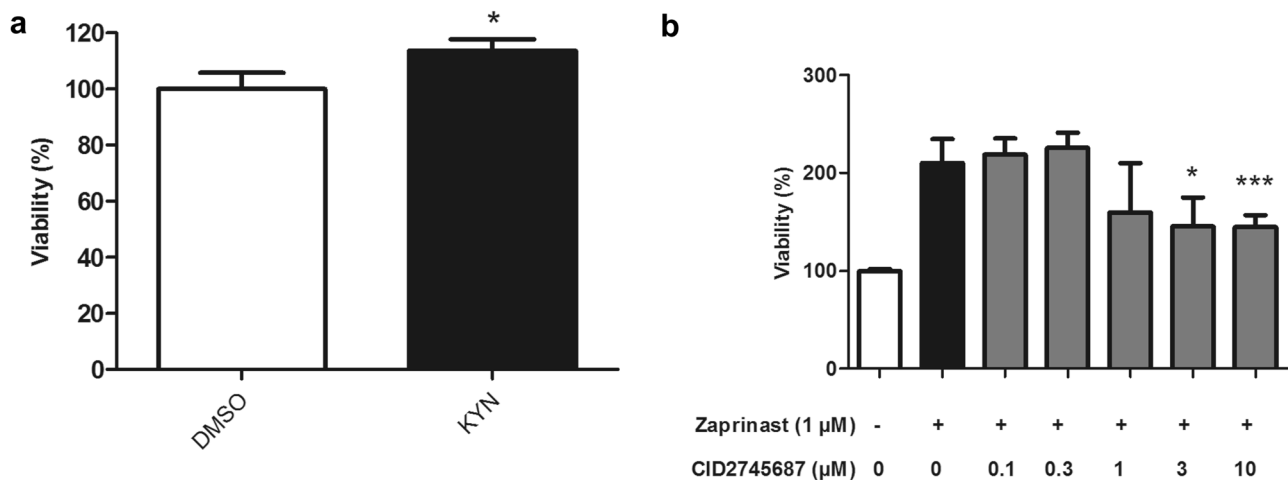


Fig. 6 Effect of kynurenic acid and CID2745687 in *DJ-1*-deficient cells. **a** MTT assays measured the viability of *DJ-1*-deficient cells in the presence of OS (induced by 100 μ M H_2O_2). Cells were either treated with vehicle (DMSO) or with 10 μ M kynurenic acid. **b** MTT assays measured the viability of *DJ-1*-deficient cells in the presence

of OS (induced with 100 μ M H_2O_2) treated with 1 μ M ZAP. Cells were either pretreated with different concentrations of CID2745687 (0.1–10 μ M) or with vehicle (-). Results were normalized to data obtained in vehicle-treated mutant cells. Error bars show s.d. from three independent biological replicates (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$)

control the ability of ZAP to increase insulin-mediated glucose uptake in skeletal muscles [66]; moreover, GPR35 has been also shown to promote glycolysis by activating Na/K-ATPase activity [67].

The GPR35 Antagonist CID2745687 Diminishes the Neuroprotective Effect of Zaprinstat in *DJ-1*-Deficient Human Cells

As previously mentioned, ZAP is a PDE inhibitor but also a GPR35 agonist. While PDE inhibitors have been already proposed as possible PD therapies [68], very little is known about the effect of GPR35 agonists in PD models. Therefore, we decided to evaluate whether GPR35 activation could exert any neuroprotective effect in our human cell PD model. First, we confirmed by RT-qPCR analyses that the *GPR35* gene was mildly expressed in SH-SY5Y cells (data not shown), as reported in [69]. Subsequently, we tested whether supplementation with kynurenine (KYN) could affect the viability of *DJ-1*-deficient cells. KYN is the precursor of kynurenic acid (KYNA) [70], which may represent the endogenous GPR35 ligand [71]. Consistently, our results showed that KYN treatment displayed a mild but significant neuroprotective effect in *DJ-1*-deficient cells (Fig. 6a), thus indicating that GPR35 agonists may represent potential candidates for PD treatment. Therefore, we hypothesized that ZAP could exert its neuroprotective effect in PD model cells through GPR35 activation. To confirm this assumption, we tested whether CID2745687 (methyl-5-[(tert-butylcarbamothioylhydrazinylidene)methyl]-1-(2,4-difluorophenyl)pyrazole-4-carboxylate), the only well-characterized GPR35 antagonist [72], could interfere with ZAP-mediated neuroprotection. We found that viability of ZAP-treated *DJ-1*-deficient cells was significantly reduced when pretreated with increasing concentrations of CID2745687 (Fig. 6b). In contrast, viability was not affected by CID2745687 treatment in *DJ-1*-deficient or control cells (Fig. S4). In summary, our results indicate that ZAP is able to reduce degeneration of PD model cells in part through GPR35 activation thus suggesting that GPR35 agonists could be considered as possible PD therapies.

Discussion

As PD remains an incurable disease and the fastest growing neurological disorder globally [73], we urgently need to develop novel, effective therapeutic strategies. With this aim, we performed an HTS assay using an in vivo *Drosophila* PD model to evaluate the effect of a range of compounds on a behavioral phenotype. To our knowledge, this study represents the first HTS assay carried out in adult flies that evaluates motor performance. We screened the PCL, a library that contains 1120 compounds most of them approved by regulatory

agencies (FDA and EMA), and tested for bioavailability and safety in humans. Hence, our results may allow drug repurposing, a new trend in drug discovery by which new therapeutic applications for an existing drug are found, accelerating their potential for use in PD patients [74]. We identified ten compounds that improved locomotor activity in *DJ-1 β* mutant flies and increased viability in *DJ-1*-deficient cells subjected to OS. We focused on the non-commercialized drug ZAP as the most efficient candidate compound regarding improvements to the viability of PD model cells. We also identified compounds that reduced motor defects in *DJ-1 β* mutant flies but had no effect on the viability of *DJ-1*-deficient cells during the validation step. While some could represent false positives, others could target other PD-relevant cell types, such as glial cells [75]; therefore, different validation assays with additional PD model cells may confirm their therapeutic potential.

ZAP is an inhibitor of the PDE1, 5, 6, 9, and 11 isoforms and a GPR35 agonist [41, 42], and studies have highlighted the expression of both PDE1 and GPR35 in the midbrain [68, 69]. PDE inhibitors have been proposed as PD therapies, evaluated in many preclinical studies, and patented as possible anti-PD drugs [68]. These compounds act by repressing the degradation of cAMP and/or cGMP, cyclic nucleotides involved in many CNS processes [68, 76]. Interestingly, alterations in cAMP and cGMP synthesis/degradation may lead to the onset of age-related diseases, including PD [76]. One of the multiple functions of both cyclic nucleotides is the regulation of the apoptosis-related Akt and JNK signaling pathways [53, 68, 77]. Here, we report that ZAP exerted a beneficial function in *DJ-1*-deficient SH-SY5Y cells by reducing stress-induced apoptosis through the activation of Akt and inhibition of JNK signaling [51, 52]. Therefore, these results agree with the function of ZAP as a PDE inhibitor. Indeed, its beneficial effect in PD model flies is probably exerted by this mechanism since no GPR35 orthologs are present in the *Drosophila* genome.

In contrast, we know relatively little about the GPR35 orphan receptor and its relation to PD, and ZAP could be acting not only as a PDE inhibitor but also as a GPR35 activator in our PD model human cells. Studies have suggested a potential role for GPR35 in regulating neuronal excitability and synaptic release [78, 79] and controlling inflammation and the immune system [72, 80]. ZAP also inhibits N-type calcium channels through GPR35 activation [81], which have been found hyperactivated and overexpressed in an α -syn mouse model and linked to axonal degeneration [82]. These findings along with our results with ZAP led us to hypothesize that the pharmacological activation of GPR35 could represent a novel therapeutic approach to PD. Supporting this assumption, we found that KYN, the precursor of the endogenous GPR35 ligand KYNA [71], displayed a mild but significant neuroprotective effect in *DJ-1*-deficient cells. Consistently, we found that pretreatment of PD model

cells with the bona fide GPR35 antagonist, CID2745687, was able to partially abolish the neuroprotective effect of ZAP in such cells. Taken together, these results indicate that GPR35 agonists may represent potential candidates for PD treatment. Interestingly, studies have demonstrated alterations to the KYN pathway (a reduction of KYNA levels) in PD patients with L-DOPA-induced dyskinesia [83]. Furthermore, while endogenous KYNA exhibits neuroprotective activity, its metabolites present neurotoxicity [84]; therefore, the KYN pathway may represent a promising target in the search for PD treatments. Accordingly, the inhibition of enzymes related to the degradation of KYNA also inhibits neurodegeneration in fly models of diseases, including PD [85].

This study also demonstrated that ZAP exerted its beneficial effect in PD models through different mechanisms. Mitochondrial alterations and high OS levels play an important role in PD development as well as in other neurodegenerative diseases [86, 87] and are strongly related to energy metabolism [60, 88]. Recent studies have highlighted the role of metabolic alterations in PD [22, 60, 61], with many genes involved in familial PD functionally linked to mitochondria (e.g., *DJ-1*, *PRKN*, or *PINK1*) [56]. Mitochondrial dysfunction leads to increased OS levels and reduced ATP production in PD models, which are counteracted by an increased glycolytic rate [22, 89, 90]. Interestingly, increasing glycolysis has been recently described as a potential therapeutic strategy for PD [22, 65]. Here, we confirmed the reduction in mitochondrial viability in *DJ-1*-deficient cells [51], which may increase OS accompanied by alterations in energy metabolism [88]. We demonstrated that ZAP supplementation increases mitochondrial viability in *DJ-1*-deficient cells, which in turn would cause a reduction in OS levels [90]. Furthermore, *DJ-1*-deficient cells pretreated with ZAP also displayed enhanced glycolysis, which led to an increase in ATP levels. As a result, ZAP exerted a protective effect in fly and human cell PD models based on *DJ-1* deficiency by intervening in several cellular alterations with a pivotal role in PD.

Despite current efforts to encounter novel treatments for PD and the proposal of a considerable amount of compounds as potential therapeutics [29, 91], PD remains an incurable disease [73]. Candidate compounds obtained in preclinical models often fail when evaluated in clinical trials due to various factors, such as disease and patient heterogeneity, inadequate trial design, inappropriate endpoints, and poor patient selection. Our knowledge regarding PD pathophysiology also remains incomplete [91, 92], thereby contributing to the selection of non-optimal candidate compounds in preclinical studies. For this reason, the identification of compounds that target multiple phenotypes in several disease models may allow for improved drug discovery in neurodegenerative diseases [36]. This study demonstrated that ZAP exerts its beneficial function in PD models through different

disease-modifying mechanisms in PD models based on *DJ-1* dysfunction. Given the discovery of over-oxidized and inactive DJ-1 protein in sporadic PD patients [23], we hypothesize that therapeutic compounds identified in *DJ-1* models could find use in individuals with sporadic PD.

In summary, we identify ZAP as a potential therapeutic compound for PD using an HTS assay in a *Drosophila* model. PD is a multifactorial disorder [93]; therefore, a multi-therapy approach may be required to treat PD patients efficiently. In this sense, ZAP represents a promising drug, given its function through both PDEs and GPR35 [41, 42], thus widening the therapeutic landscape. Although our results clearly demonstrate that the neuroprotective effect of ZAP in PD model cells is reduced by pretreatments with the GPR35 antagonist CID2745687, further studies are required to validate GPR35 agonists as novel therapies for PD. This study also validates *Drosophila* as a valuable model organism with huge potential in the drug discovery field, which may lead to the identification of novel therapies for PD and other human diseases.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s13311-021-01134-2>.

Acknowledgements We are grateful to Dr. Chung and Dr. A. J. Whitworth for providing fly stocks and to Stuart P. Atkinson for English editing.

Required Author Forms Disclosure forms provided by the authors are available with the online version of this article.

Funding Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature. This work was supported by the University of Valencia [grant number UV-INV-AE17-702300 to N.P.].

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

References

1. Andrejack J, Mathur S. What People with Parkinson's Disease Want. J. Parkinsons. Dis. IOS Press BV; 2020. p. S5–10.
2. Prell T, Witte OW, Grosskreutz J. Biomarkers for Dementia, Fatigue, and Depression in Parkinson's Disease. Front Neurol. 2019;10:1–13.
3. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: Mechanisms and models. Neuron. Cell Press; 2003. p. 889–909.

4. Scott L, Dawson VL, Dawson TM. Trumping neurodegeneration: Targeting common pathways regulated by autosomal recessive Parkinson's disease genes. *Exp. Neurol.* Academic Press Inc.; 2017. p. 191–201.
5. Kaur R, Mehan S, Singh S. Understanding multifactorial architecture of Parkinson's disease: pathophysiology to management. *Neurol Sci.* Springer Milan; 2019;40:13–23.
6. Anandhan A, Jacome MS, Lei S, et al. Metabolic Dysfunction in Parkinson's Disease: Bioenergetics, Redox Homeostasis and Central Carbon Metabolism. *Brain Res. Bull.* NIH Public Access; 2017. p. 12–30.
7. Athauda D, Foltynie T. The ongoing pursuit of neuroprotective therapies in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* Nature Publishing Group; 2015. p. 25–40.
8. Oertel WH. Recent advances in treating Parkinson's disease. *F1000Research.* Faculty of 1000 Ltd; 2017;6:260.
9. Stoker TB, Torsney KM, Barker RA. Emerging treatment approaches for Parkinson's disease. *Front. Neurosci.* Frontiers Media S.A.; 2018. p. 693.
10. Camilleri A, Vassallo N. The Centrality of mitochondria in the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *CNS Neurosci. Ther.* Blackwell Publishing Ltd; 2014. p. 591–602.
11. M. Wilkins H, K. Morris J. New Therapeutics to Modulate Mitochondrial Function in Neurodegenerative Disorders. *Curr Pharm Des.* Bentham Science Publishers Ltd.; 2017;23:731–52.
12. McFarthing K, Buff S, Rafaloff G, Dominey T, Wyse RK, Stott SRW. Parkinson's Disease Drug Therapies in the Clinical Trial Pipeline: 2020. *J. Parkinsons. Dis.* IOS Press; 2020. p. 757–74.
13. Bandres-Ciga S, Diez-Fairen M, Kim JJ, Singleton AB. Genetics of Parkinson's disease: An introspection of its journey towards precision medicine. *Neurobiol. Dis.* Academic Press Inc.; 2020. p. 104782.
14. Niemann N, Jankovic J. Juvenile parkinsonism: Differential diagnosis, genetics, and treatment. *Park. Relat. Disord.* Elsevier Ltd; 2019. p. 74–89.
15. Chai C, Lim K-L. Genetic insights into sporadic Parkinson's disease pathogenesis. *Curr Genomics.* Bentham Science Publishers; 2013;14:486–501.
16. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, et al. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Prim.* Nature Publishing Group; 2017;3:1–21.
17. Blauwendraat C, Nalls MA, Singleton AB. The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* Lancet Publishing Group; 2020. p. 170–8.
18. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science.* American Association for the Advancement of Science; 2003;299:256–9.
19. Hijioka M, Inden M, Yanagisawa D, Kitamura Y. DJ-1/PARK7: A New Therapeutic Target for Neurodegenerative Disorders. *Biol Pharm Bull.* 2017;40:548–52.
20. Sharma N, Rao SP, Kalivendi S V. The deglycase activity of DJ-1 mitigates α -synuclein glycation and aggregation in dopaminergic cells: Role of oxidative stress mediated downregulation of DJ-1 in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med.* Pergamon; 2019;135:28–37.
21. Larsen SB, Hanss Z, Krüger R. The genetic architecture of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res.* Springer; 2018;373:21–37.
22. Solana-Manrique C, Sanz FJ, Ripollés E, et al. Enhanced activity of glycolytic enzymes in Drosophila and human cell models of Parkinson's disease based on DJ-1 deficiency. *Free Radic Biol Med.* Elsevier Inc.; 2020;158:137–48.
23. Repici M, Giorgini F. DJ-1 in Parkinson's Disease: Clinical Insights and Therapeutic Perspectives. *J Clin Med.* MDPI AG; 2019;8:1377.
24. Ariga H, Takahashi-Niki K, Kato I, Maita H, Niki T, Iguchi-Ariga SMM. Neuroprotective function of DJ-1 in Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev.* Hindawi Limited; 2013;2013:683920.
25. Martin CA, Krantz DE. *Drosophila melanogaster* as a genetic model system to study neurotransmitter transporters. *Neurochem. Int.* Elsevier Ltd; 2014. p. 71–88.
26. McGurk L, Berson A, Bonini NM. *Drosophila* as an in vivo model for human neurodegenerative disease. *Genetics.* Genetics; 2015;201:377–402.
27. Hindle SJ, Bainton RJ. Barrier mechanisms in the *Drosophila* blood-brain barrier. *Front. Neurosci.* Frontiers Media S.A.; 2014.
28. Tsuda L, Lim Y-M. *Alzheimer's Disease Model System Using Drosophila.* Springer, Singapore; 2018. p. 25–40.
29. Solana-Manrique C, Moltó MD, Calap-Quintana P, Sanz FJ, Llorens JV, Paricio N. *Drosophila* as a model system for the identification of pharmacological therapies in neurodegenerative diseases. *Insights into Hum Neurodegener Lessons Learn from Drosoph.* Springer Singapore; 2019. p. 433–67.
30. Paricio N, Muñoz-Soriano V. *Drosophila* models of Parkinson's disease: Discovering relevant pathways and novel therapeutic strategies. *Parkinsons. Dis.* Hindawi Limited; 2011.
31. Lavara-Culebras E, Paricio N. *Drosophila* DJ-1 mutants are sensitive to oxidative stress and show reduced lifespan and motor deficits. *Gene.* Elsevier; 2007;400:158–65.
32. Casani S, Gómez-Pastor R, Matallana E, Paricio N. Antioxidant compound supplementation prevents oxidative damage in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med.* Pergamon; 2013;61:151–60.
33. Lavara-Culebras E, Muñoz-Soriano V, Gómez-Pastor R, Matallana E, Paricio N. Effects of pharmacological agents on the lifespan phenotype of *Drosophila* DJ-1 β mutants. *Gene.* Elsevier; 2010;462:26–33.
34. Sanz FJ, Solana-Manrique C, Muñoz-Soriano V, Calap-Quintana P, Moltó MD, Paricio N. Identification of potential therapeutic compounds for Parkinson's disease using *Drosophila* and human cell models. *Free Radic Biol Med.* Pergamon; 2017;108:683–91.
35. Konieczny P, Artero R. *Drosophila* SMN2 minigene reporter model identifies moxifloxacin as a candidate therapy for SMA. *FASEB J.* John Wiley and Sons Inc.; 2020;34:3021–36.
36. Homberg JR, Kyzar EJ, Stewart AM, et al. Improving treatment of neurodevelopmental disorders: recommendations based on pre-clinical studies. *Expert Opin Drug Discov.* Taylor and Francis Ltd; 2016;11:11–25.
37. Park J, Sung YK, Cha GH, Sung BL, Kim S, Chung J. *Drosophila* DJ-1 mutants show oxidative stress-sensitive locomotive dysfunction. *Gene.* 2005;361:133–9.
38. Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, Andrews LA, Feany MB, Pallanck LJ. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* National Academy of Sciences; 2003;100:4078–83.
39. Aldewachi H, Al-Zidan RN, Conner MT, Salman MM. High-Throughput Screening Platforms in the Discovery of Novel Drugs for Neurodegenerative Diseases. *Bioengineering.* 2021;8:30.
40. Krentz AJ, Weyer C, Hompesch M. Translational research methods in diabetes, obesity, and nonalcoholic fatty liver disease: A focus on early phase clinical drug development. *Transl. Res. Methods Diabetes, Obesity, Nonalcoholic Fat. Liver Dis.* A Focus Early Phase Clin. Drug Dev. Springer International Publishing; 2019.
41. Medina AE. Therapeutic utility of phosphodiesterase type I inhibitors in neurological conditions. *Front. Neurosci.* Frontiers Media SA; 2011.
42. Taniguchi Y, Tonai-Kachi H, Shinjo K. Zaprinast, a well-known cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase inhibitor, is an agonist for GPR35. *FEBS Lett.* FEBS Lett; 2006;580:5003–8.
43. Tozzi A, Costa C, Siliquini S, et al. Mechanisms underlying altered striatal synaptic plasticity in old A53T- α synuclein overexpressing mice. *Neurobiol. Aging.* Neurobiol. Aging; 2012;33:1792–9.

44. Picconi B, Bagetta V, Ghiglieri V, et al. Inhibition of phosphodiesterases rescues striatal long-term depression and reduces levodopa-induced dyskinesia. *Brain*. Oxford University Press; 2011;134:375–87.
45. Solís O, Espadas I, Del-Bel EA, Moratalla R. Nitric oxide synthase inhibition decreases L-DOPA-induced dyskinesia and the expression of striatal molecular markers in *Pitx3*^{-/-} aphakia mice. *Neurobiol Dis*. Academic Press Inc.; 2015;73:49–59.
46. Raininga P V., Di Trapani G, Tonissen KF. The multifaceted roles of DJ-1 as an antioxidant. *Adv Exp Med Biol*. Springer New York LLC; 2017. p. 67–87.
47. Yang J, Kim MJ, Yoon W, et al. Isocitrate protects DJ-1 null dopaminergic cells from oxidative stress through NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase (IDH). *PLoS Genet*. Public Library of Science; 2017;13.
48. Day JP, Dow JAT, Houslay MD, Davies S-A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases in *Drosophila melanogaster*. *Biochem J*. Portland Press Ltd; 2005;388:333.
49. Erekat NS. Apoptosis and its Role in Parkinson's Disease. *Park Dis Pathog Clin Asp*. Codon Publications; 2018. p. 65–82.
50. Ambacher KK, Pitzul KB, Karajigikar M, Hamilton A, Ferguson SS, Cregan SP. The JNK- and AKT/GSK3 β - Signaling Pathways Converge to Regulate Puma Induction and Neuronal Apoptosis Induced by Trophic Factor Deprivation. Hetman M, editor. *PLoS One*. Public Library of Science; 2012;7:e46885.
51. Zhang XL, Wang ZZ, Shao QH, et al. RNAi-mediated knockdown of DJ-1 leads to mitochondrial dysfunction via Akt/GSK-3 β and JNK signaling pathways in dopaminergic neuron-like cells. *Brain Res Bull*. Elsevier Inc.; 2019;146:228–36.
52. Dhanasekaran DN, Premkumar Reddy E. JNK-signaling: A multiplexing hub in programmed cell death. *Genes and Cancer*. Impact Journals LLC; 2017. p. 682–94.
53. Peixoto CA, Nunes AKS, Garcia-Osta A. Phosphodiesterase-5 inhibitors: Action on the signaling pathways of neuroinflammation, neurodegeneration, and cognition. *Mediators Inflamm*. Hindawi Publishing Corporation; 2015.
54. Joshi R, Kadeer N, Sheriff S, Friend LA, James JH, Balasubramaniam A. Phosphodiesterase (PDE) inhibitor torbafylline (HWA 448) attenuates burn-induced rat skeletal muscle proteolysis through the PDE4/cAMP/EPAC/PI3K/Akt pathway. *Mol Cell Endocrinol*. Elsevier Ireland Ltd; 2014;393:152–63.
55. Sharmin O, Abir AH, Potal A, et al. Activation of GPR35 protects against cerebral ischemia by recruiting monocyte-derived macrophages. *Sci Rep*. Nature Research; 2020;10:1–13.
56. Park JS, Davis RL, Sue CM. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: New Mechanistic Insights and Therapeutic Perspectives. *Curr Neurol Neurosci Rep*. Current Medicine Group LLC 1; 2018.
57. Andres-Mateos E, Perier C, Zhang L, et al. DJ-1 gene deletion reveals that DJ-1 is an atypical peroxiredoxin-like peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. National Academy of Sciences; 2007;104:14807–12.
58. Krebichl G, Ruckerbauer S, Burbulla LF, et al. Reduced Basal Autophagy and Impaired Mitochondrial Dynamics Due to Loss of Parkinson's Disease-Associated Protein DJ-1. Petrucelli L, editor. *PLoS One*. Public Library of Science; 2010;5:e9367.
59. Heslop KA, Rovini A, Hunt EG, et al. JNK activation and translocation to mitochondria mediates mitochondrial dysfunction and cell death induced by VDAC opening and sorafenib in hepatocarcinoma cells. *Biochem Pharmacol*. Elsevier Inc.; 2020;171:113728.
60. Anandhan A, Jacome MS, Lei S, et al. Metabolic Dysfunction in Parkinson's Disease_ Bioenergetics, Redox Homeostasis and Central Carbon Metabolism. 2017;
61. Shukla AK, Ratnasekhar C, Pragma P, et al. Metabolomic Analysis Provides Insights on Paraquat-Induced Parkinson-Like Symptoms in *Drosophila melanogaster*. *Mol Neurobiol*. Humana Press Inc.; 2016;53:254–69.
62. Requejo-Aguilar R, Lopez-Fabuel I, Jimenez-Blasco D, Fernandez E, Almeida A, Bolaños JP. DJ1 represses glycolysis and cell proliferation by transcriptionally upregulating pink1. *Biochem J*. NIH Public Access; 2015;467:303.
63. Chen R, Park H-A, Mnatsakanyan N, et al. Parkinson's disease protein DJ-1 regulates ATP synthase protein components to increase neuronal process outgrowth. *Cell Death Dis*. Nature Publishing Group; 2019;10.
64. Teslaa T, Teitell MA. Techniques to monitor glycolysis. *Methods Enzymol*. Academic Press Inc.; 2014. p. 91–114.
65. Cai R, Zhang Y, Simmering JE, et al. Enhancing glycolysis attenuates Parkinson's disease progression in models and clinical databases. *J Clin Invest*. American Society for Clinical Investigation; 2019;129:4539–49.
66. Genders AJ, Bradley EA, Rattigan S, Richards SM. cGMP phosphodiesterase inhibition improves the vascular and metabolic actions of insulin in skeletal muscle. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. American Physiological Society Bethesda, MD; 2011;301:E342–50.
67. Schneditz G, Elias JE, Pagano E, et al. GPR35 promotes glycolysis, proliferation, and oncogenic signaling by engaging with the sodium potassium pump. *Sci Signal*. American Association for the Advancement of Science; 2019;12:9048.
68. Nthenge-Ngumbau DN, Mohanakumar KP. Can Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Inhibitors Be Drugs for Parkinson's Disease? *Mol Neurobiol*. Springer; 2018. p. 822–34.
69. The Human Protein Atlas [Internet]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/>
70. Fukuwatari T. Possibility of amino acid treatment to prevent the psychiatric disorders via modulation of the production of tryptophan metabolite kynurenic acid. *Nutrients*. MDPI AG; 2020.
71. Cosi C, Mannaioni G, Cozzi A, et al. G-protein coupled receptor 35 (GPR35) activation and inflammatory pain: Studies on the antinociceptive effects of kynurenic acid and zaprinast. *Neuropharmacology*. Pergamon; 2011;60:1227–31.
72. Quon T, Lin L-C, Ganguly A, Tobin AB, Milligan G. Therapeutic Opportunities and Challenges in Targeting the Orphan G Protein-Coupled Receptor GPR35. *Cite This ACS Pharmacol Transl Sci*. 2020;2020:812.
73. Vacca VM. Parkinson disease. *Nursing (Lond)*. NLM (Medline); 2019;49:24–32.
74. Gasparini F, Di Paolo T. Drug repurposing: Old drugs, new tricks to fast track drug development for the brain. *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd; 2019. p. 1–3.
75. Domingues A V., Pereira IM, Vilaça-Faria H, Salgado AJ, Rodrigues AJ, Teixeira FG. Glial cells in Parkinson's disease: protective or deleterious? *Cell Mol Life Sci*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2020. p. 5171–88.
76. Kelly MP. Cyclic nucleotide signaling changes associated with normal aging and age-related diseases of the brain. *Cell Signal*. Elsevier Inc.; 2018. p. 281–91.
77. Zhang J, Wang Q, Zhu N, et al. Cyclic AMP inhibits JNK activation by CREB-mediated induction of c-FLIPL and MKP-1, thereby antagonizing UV-induced apoptosis. *Cell Death Differ*. Cell Death Differ; 2008;15:1654–62.
78. Mackenzie AE, Milligan G. The emerging pharmacology and function of GPR35 in the nervous system. *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd; 2017. p. 661–71.
79. Reggio PH, Shore DM. The therapeutic potential of orphan GPCRs, GPR35 and GPR55. *Front Pharmacol*. Frontiers Media S.A.; 2015;6.
80. Divorcy N, Mackenzie AE, Nicklin SA, Milligan G. G protein-coupled receptor 35: an emerging target in inflammatory and cardiovascular disease. *Front Pharmacol*. Frontiers Media S.A.; 2015;6:41.
81. Guo J, Williams DJ, Puhl HL, Ikeda SR. Inhibition of N-type calcium channels by activation of GPR35, an orphan receptor,

- heterologously expressed in rat sympathetic neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* *J Pharmacol Exp Ther*; 2008;324:342–51.
82. Sgobio C, Sun L, Ding J, Herms J, Lovinger DM, Cai H. Unbalanced calcium channel activity underlies selective vulnerability of nigrostriatal dopaminergic terminals in Parkinsonian mice. *Sci Rep.* Nature Publishing Group; 2019;9.
83. Havelund JF, Andersen AD, Binzer M, et al. Changes in kynurenine pathway metabolism in Parkinson patients with L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurochem.* Blackwell Publishing Ltd; 2017;142:756–66.
84. Venkatesan D, Iyer M, Narayanasamy A, Siva K, Vellingiri B. Kynurenine pathway in Parkinson's disease—An update. *eNeurologicalSci.* Elsevier B.V.; 2020. p. 100270.
85. Breda C, Sathyaikumar K V., Idrissi SS, et al. Tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) inhibition ameliorates neurodegeneration by modulation of kynurenine pathway metabolites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* National Academy of Sciences; 2016;113:5435–40.
86. Grünewald A, Kumar KR, Sue CM. New insights into the complex role of mitochondria in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* Elsevier Ltd; 2019. p. 73–93.
87. Pozo Devoto VM, Falzone TL. Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease: A role for α -synuclein? *DMM Dis. Model. Mech.* Company of Biologists Ltd; 2017. p. 1075–87.
88. Bolaños JP, Moro MA, Lizasoain I, Almeida A. Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: Therapeutic implications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* Elsevier; 2009. p. 1299–315.
89. Requejo-Aguilar R, Bolaños JP. Mitochondrial control of cell bioenergetics in Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.* Elsevier Inc.; 2016. p. 123–37.
90. Giachin G, Bouverot R, Acajjaoui S, Pantalone S, Soler-López M. Dynamics of human mitochondrial complex I assembly: Implications for neurodegenerative diseases. *Front. Mol. Biosci.* Frontiers Media S.A.; 2016. p. 43.
91. Elkouzi A, Vedam-Mai V, Eisinger RS, Okun MS. Emerging therapies in Parkinson disease — repurposed drugs and new approaches. *Nat. Rev. Neurol.* Nature Publishing Group; 2019. p. 204–23.
92. Athauda D, Foltynie T. Challenges in detecting disease modification in Parkinson's disease clinical trials. *Park. Relat. Disord.* Elsevier Ltd; 2016. p. 1–11.
93. Pang SYY, Ho PWL, Liu HF, et al. The interplay of aging, genetics and environmental factors in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Transl. Neurodegener.* BioMed Central Ltd.; 2019. p. 1–11.

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

RESEARCH ARTICLE

Exploring the link between Parkinson's disease and type 2 diabetes mellitus in *Drosophila*

Francisco José Sanz^{1,2} | Cristina Solana-Manrique^{1,2} | Joaquín Lilao-Garzón³ |
 Yeray Brito-Casillas³ | Silvia Muñoz-Descalzo³ | Nuria Paricio^{1,2} 

¹Departamento de Genética, Facultad CC Biológicas, Universidad de Valencia, Burjassot, Spain

²Instituto Universitario de Biotecnología y Biomedicina (BIOTECMED), Universidad de Valencia, Burjassot, Spain

³Instituto Universitario de Investigaciones Biomédicas y Sanitarias (IUIBS), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), Las Palmas de Gran Canaria, Spain

Correspondence

Nuria Paricio, Departamento de Genética, Facultad de CC Biológicas, Universidad de Valencia, Dr. Moliner 50, E-46100 Burjassot, Spain.
 Email: nuria.paricio@uv.es

Funding information

Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACIISI), Grant/Award Number: CEI2019-02; Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC), Grant/Award Number: ProID2020010013; Universitat de València (85186), Grant/Award Number: UV-INV-AE-1553209

Abstract

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease. Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease characterized by high levels of glucose in blood. Recent epidemiological studies have highlighted the link between both diseases; it is even considered that DM might be a risk factor for PD. To further investigate the likely relation of these diseases, we have used a *Drosophila* PD model based on inactivation of the *DJ-1 β* gene (ortholog of human *DJ-1*), and diet-induced *Drosophila* and mouse type 2 DM (T2DM) models, together with human neuron-like cells. T2DM models were obtained by feeding flies with a high sugar-containing medium, and mice with a high fat diet. Our results showed that both fly models exhibit common phenotypes such as alterations in carbohydrate homeostasis, mitochondrial dysfunction or motor defects, among others. In addition, we demonstrated that T2DM might be a risk factor of developing PD since our diet-induced fly and mouse T2DM models present DA neuron dysfunction, a hallmark of PD. We also confirmed that neurodegeneration is caused by increased glucose levels, which has detrimental effects in human neuron-like cells by triggering apoptosis and leading to cell death. Besides, the observed phenotypes were exacerbated in *DJ-1 β* mutants cultured in the high sugar medium, indicating that DJ-1 might have a role in carbohydrate homeostasis. Finally, we have confirmed that metformin, an antidiabetic drug, is a potential candidate for PD treatment and that it could prevent PD onset in T2DM model flies. This result supports antidiabetic compounds as promising PD therapeutics.

KEYWORDS

drosophila, high fat/sugar diet, mouse model, neurodegeneration, Parkinson's disease, type 2 diabetes mellitus

Abbreviations: DA, dopaminergic; DM, diabetes mellitus; ER, endoplasmic reticulum; fPD, familial Parkinson's disease; HFD, high fat diet; HSD, high sugar diet; ILP, insulin-like peptide; ISP, insulin signaling pathway; MET, metformin; ND, normal diet; OS, oxidative stress; PD, Parkinson's disease; ROS, reactive oxygen species; SPD, sporadic Parkinson's disease; T1DM, type 1 diabetes mellitus; T2DM, type 2 diabetes mellitus; TCA, tricarboxylic acid; TH, tyrosine hydroxylase.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2022 The Authors. *The FASEB Journal* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of Federation of American Societies for Experimental Biology.

1 | INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease, and the first motor disorder affecting more than 1%–3% of the worldwide population over 60 years.^{1,2} Its major pathological hallmark is the selective loss of dopaminergic (DA) neurons in the substantia nigra pars compacta, which leads to PD-characteristic motor deficits. However, the exact cause of this neurodegeneration remains unknown.³ To date, multiple pathways appear to contribute to PD onset and progression, like accumulation of misfolded protein aggregates, mitochondrial dysfunction, oxidative stress (OS), neuroinflammation, endoplasmic reticulum (ER) stress, or genetic mutations. In addition, metabolic alterations have been recently shown to play an important role in PD physiopathology. Specifically, a possible link between glucose metabolism alterations and neurodegeneration has been demonstrated.^{4–8} Even though the majority of PD cases are sporadic (sPD), several genes responsible for familial PD forms (fPD) have been identified.⁹ Interestingly, the study of their functions has provided useful information to decipher several molecular mechanisms underlying PD.¹⁰ Among them, *DJ-1*, initially described as an oncogene, is a causative gene of early-onset fPD.¹¹ However, further studies demonstrated that the DJ-1 protein have additional functions such as antioxidant, via free-radical scavenging and transcriptional regulation of antioxidant genes, as mitochondrial function modulator, deglycase, redox-dependent molecular chaperone, and as a factor involved in proteolysis and metabolism.^{6,7,12}

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease characterized by high levels of glucose in blood, due to a diminished insulin production or to the appearance of insulin resistance. There are, mainly, two types of DM: type 1 DM (T1DM) and type 2 DM (T2DM). T1DM is due to the autoimmune loss of pancreatic β -cells, whereas T2DM is caused by the appearance of insulin resistance and a progressive decrease of insulin production in β -cells.^{13,14} The genetics of T2DM is complex and not completely defined. In addition, its prevalence is growing worldwide and it accounts for the 90%–95% of the cases of DM.^{13,15} Interestingly, there is growing evidence that an important link between PD and T2DM does exist.^{16,17} In fact, T2DM and PD share characteristic phenotypes such as mitochondrial dysfunction, increased OS levels, inflammation and ER stress, which eventually might lead to the activation of the apoptotic pathway.^{14,18} Moreover, brain is one of the major targets of insulin; therefore, dysregulation of the insulin signaling pathway (ISP) may exert detrimental effects in neurons, and even be the cause of cell death.¹⁹ In addition, due to the common phenotypes found between both diseases, several antidiabetic drugs are being tested as potential PD treatments.^{14,17,20}

Animal models have become powerful tools to study and identify pathogenic mechanisms underlying human diseases like PD and DM.^{21–23} In this scenario, we work with a *Drosophila* PD model based on inactivation of the *DJ-1 β* gene (ortholog of human *DJ-1*). Previous studies demonstrated that *DJ-1 β* mutant flies displayed PD-related phenotypes like motor defects and reduced lifespan. Moreover, these flies showed alterations in the activity of enzymes involved in the defense against OS and, in consequence, increased OS marker levels such as several reactive oxygen species (ROS) and protein carbonylation.^{24–26} Furthermore, we have also shown that *DJ-1 β* mutant flies display metabolic disturbances reflected by an increase in the glycolytic pathway and alterations in several metabolite levels.^{6,7} *Drosophila* has also emerged as an excellent model for DM since it uses triacylglycerols and glycogen to store energy like humans. In addition, *Drosophila* synthesizes insulin-like peptides (ILP), which are secreted by specialized neurons, named insulin-producing cells, and glia in the brain.²⁷ There are seven ILPs that are partially redundant^{27,28}; however, ILP2, 3 and 5 are the most important considering glycemia control.²⁹ Moreover, *Drosophila* regulates glucose homeostasis through the ISP, which is evolutionary conserved and contains similar elements and regulatory interactions than those found in human ISP.³⁰ To date, several strategies have been developed to model T2DM in this organism.^{31,32} One involves feeding flies with an hypercaloric medium, in which sugar, protein, or lipid content is increased with respect to regular food; alternatively T2DM can be modeled by silencing several genes like those encoding ISP components, among others.^{31,32}

In this study, we have used PD and T2DM model flies, a mouse T2DM model and neuron-like human cells to identify links between both diseases. The *Drosophila* T2DM model is a diet-induced one in which wild-type flies were fed with high sugared medium³²; the mouse T2DM model is a well established one based on high-fat diet,³³ which is the best one reflecting the human disease as it develops together with obesity. While in flies, simple sugars from food are taken up passively from the digestive tract, in mice the excess of energy from the hypercaloric diet is stored as fat, inducing obesity. Fat accumulation leads to insulin resistance, hyperglycemia, and ultimately T2DM.³⁴ Our results showed that *Drosophila* PD and T2DM models exhibit common phenotypes like alterations in carbohydrate metabolism, mitochondrial dysfunction or motor defects, among others. In addition, we demonstrated that both fly and mouse T2DM models presented DA neuron dysfunction, a hallmark of PD. We have also confirmed that increased glucose levels have a detrimental effect in human neuron-like cells by triggering apoptosis, which leads to cell death. Besides, the hypercaloric medium used to

generate T2DM model flies exacerbated those phenotypes in *DJ-1β* mutants, indicating that DJ-1 might have a role in carbohydrate homeostasis. Finally, we have confirmed that metformin, an antidiabetic drug, is a potential candidate for PD treatment and that it could prevent PD onset in T2DM model flies.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Fly stocks and culture conditions

Fly stocks employed in this study were *y,w* (Bloomington *Drosophila* Stock Center #6598: *y¹,w¹¹¹⁸*) and the *DJ-1β^{ex54}* strain (referred to as *DJ-1β*) from the J. Chung laboratory.³⁵ Stocks and fly crosses were cultured using standard *Drosophila* medium at 25°C. Newly eclosed female flies were fed either with control medium (normal diet, ND) or with a high sugar medium (high sugar diet, HSD), prepared using standard *Drosophila* food supplemented with sucrose to a final concentration of 30%. Flies were transferred to new vials every 2–3 days. When performing metformin treatments, vials with either control or high sugar medium contained a final concentration of 25 mM of this compound (Sigma-Aldrich).

2.2 | Rotenone exposure

For rotenone treatment, 1-day-old *y,w* female flies were cultured in standard *Drosophila* feed supplemented with 500 μM rotenone for 7 days (rotenone was dissolved in DMSO and a stock of 100 mM was prepared). Flies were transferred to new vials every 2 days.

2.3 | Determination of glycogen and soluble carbohydrates

Glycogen and soluble carbohydrates were calculated using a protocol adapted from Ref. [36]. Briefly, groups of five 15-day-old female flies of each genotype and culture condition were homogenized in 200 μl of PBS with a steel bead using a TyssueLyser LT (Qiagen) for 2 min at 50 Hz. Fly extracts were further centrifuged at 180g for 10 min at 4°C in order to discard debris. Next, 90 μl of the supernatant were collected, to which 10 μl of sodium sulfate 20% (w/v) and 750 μl of methanol were added. After vortexing the sample, it was centrifuged at 180g for 15 min at 4°C. In this step, glycogen remained in the pellet and soluble carbohydrates in the supernatant. For glycogen estimation, pellet was washed twice with 80% methanol. Then, 1 ml of anthrone reagent (1.42 mg/ml in sulfuric

acid 70% [v/v]) was added and samples were heated at 90°C for 15 min. Subsequently, samples were cooled on ice and centrifuged. About 200 μl of each replicate was added in a 96-well plate and absorbance was measured at 625 nm using an Infinite 200 PRO reader (Tecan). For soluble carbohydrates estimation, supernatant was evaporated until a volume of 20 μl remained, and 750 μl of anthrone reagent was next added. Samples were heated at 90°C for 15 min and, subsequently, cooled on ice. A volume of 200 μl of each sample was transferred to a 96-well plate, and absorbance was measured at 625 nm. In all experiments, three replicates per each culture condition were carried out.

2.4 | Weight estimation

Groups of ten 15-day-old flies of each genotype and culture condition were weighed in a microbalance to estimate their total weight. At least, six replicates per each group of flies were studied.

2.5 | Measurement of ATP levels

ATP levels were measured as described in Ref. [7] using the ATP Determination Kit (Invitrogen) following manufacturer's instructions. Briefly, groups of five female flies were homogenized in 200 μl of reaction buffer (supplied by the commercial kit). Then, fly extracts were boiled 4 min and centrifuged at 18 500g for 10 min at 4°C in order to discard debris. Subsequently, 5 μl of fly extracts were added to 100 μl of the standard reaction solution in a white 96-well plate and luminescence was measured using an Infinite 200 PRO reader (Tecan). All experiments were performed in triplicate.

2.6 | RT-qPCR analyses

Total RNA from ten 15-day-old T2DM model or control female flies was extracted and reverse transcribed as described in Ref. [6]. RT-qPCR was performed as in Ref. [6], and the following pairs of primers were used: *tubulin* direct primer (5'-GATTACCGCCTCTCTGCGAT-3'); *tubulin* reverse primer (5'-ACCAGAGGGAAGTGAATACGTG-3'); *PI3K* direct primer (5'-ATTTGGACTACCTACGGAA-3'); *PI3K* reverse primer (5'-TGCTTTTCTCCGTGTAG-3'); *InR* direct primer (5'-TTTCACGGAAGTCAACATA-3'); *InR* reverse primer (5'-GACCTTAGCATAGCTCGG-3'); *chico* direct primer (5'-TATGCACAACACGATACTGAG-3'); *chico* reverse primer (5'-GACTCTGTTTTGGCTGACA-3'). *tubulin* levels were measured and used as an internal

control for RNA amount in each sample. All experiments were performed in quadruplicate.

2.7 | Climbing assays

Motor performance of flies was analyzed by carrying out a climbing assay as previously described in Ref. [37]. Briefly, groups of 10–20 female flies were transferred to graduated plastic tubes, acclimated for 1 min, gently tapped down to the tube bottom, and allowed to climb for 10 s. At least four groups of each condition were analyzed and the climbing ability was measured as the average height reached by each group after 10 s.

2.8 | T2DM mouse model

Mouse work was conducted in accordance with National and European requirements (RD 1201/2005, Law 32/2007, EU Directive 2010/63/EU) and was approved by the animal ethics research committee (re-used animals from protocol OEBA-ULPGC 10/2019R1) from the University of Las Palmas de Gran Canaria.

Brains from 10-month-old C57BL/6J female mice randomly assigned to be fed with either standard diet (ND) (Envigo, Global Diet 2014) or high fat diet (HFD) (60% energy from fat, D12492; Research Diets, New Brunswick, NJ) for 12 weeks³³ were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Brains were thawed and dissected to obtain the Caudate-Putamen region. 100 mg samples were homogenized in 1 ml of RIPA buffer supplemented with a protease inhibitor cocktail (PPC1010, Sigma-Aldrich) with an Ultra-Turrax T25 device. Then, lysates were sonicated (Bioruptor[®] Standard, Diagenode) on ice for 20 min in 30 s pulses and centrifuged 10 000 g for 20 min.

2.9 | Cell culture and metformin treatment

DJ-1-deficient and *pLKO.1* control SH-SY5Y cells previously generated by our laboratory³⁷ were cultured in selective growth medium consisting of Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) (Biowest) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Capricorn), 1% non-essential amino acids, and 100 mg/ml penicillin/streptomycin (Labclinics) at 37°C and 5% CO_2 . Cell viability after supplementation with different concentrations of glucose or MET was evaluated using an MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, as previously described in Ref. [6].

2.10 | Quantification of protein carbonyl group formation

Protein carbonylation levels were measured in 15-day-old flies cultured in ND and HSD containing 0.1% DMSO for untreated control experiments or supplemented with a final concentration of 25 mM metformin for treatment experiments. Protein carbonyl groups were measured in fly extracts using 2,4-dinitrophenyl hydrazine derivatization in 96-well plates (Greiner 96-well plate, polypropylene) as previously described in Ref. [6]. All experiments were carried out using three biological replicates and three technical replicates for each sample.

2.11 | Western blotting

Western blots were performed as described in Ref. [6]. Protein extraction of flies fed with either ND or HSD, and supplemented with either 25 mM MET or 0.1% DMSO as control, was adapted from Ref. [6]. Briefly, fifty 28-day-old fly heads were homogenized in 200 μl of 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, with a steel bead in a TissueLyser LT (Qiagen) for 3 min at 50 Hz. Fly extracts were centrifuged at 14 500 g for 10 min at 4°C and supernatant was collected. Protein extraction of *pLKO.1* SH-SY5Y cells treated with 125 μM of glucose or control medium was carried out as previously described in Ref. [6]. Protein extraction of mouse brain was carried out as commented above (see T2DM mouse model section). The primary antibodies used were anti-TH (1:1000, Sigma), anti- α -tubulin (1:5000; Hybridoma Bank; 12G10), anti-JNK, anti-phospho-JNK (Thr183/Tyr185) (1:1000, Cell Signaling), and β -actin (1:1000, Santa Cruz). Secondary antibodies used were anti-rabbit or anti-mouse HRP-conjugated (1:5000, Sigma). Quantifications of protein levels were performed with an ImageQuant[™] LAS 4000 mini Biomolecular Imager (GE Healthcare), and images were analyzed with ImageJ software (NIH).

2.12 | Enzymatic assays

The enzymatic activities of phosphofructokinase (Pfk; EC 2.7.1.11), pyruvate kinase (Pk; EC 2.7.1.40), and hexokinase (Hk; EC 2.7.1.1) were measured using coupled enzymatic assays in extracts of 15-day-old flies fed with either ND or HSD, as previously described in Ref. [6]. All experiments were performed in triplicate.

2.13 | Statistical analyses

The significance of differences between means was assessed using a *t*-test when two experimental groups were

analyzed. In experiments in which more than two experimental groups were used, the statistical analysis was made using the ANOVA test and Tukey's post-hoc test. Differences were considered significant when $p < .05$. Data are expressed as means \pm standard deviation (SD).

3 | RESULTS

3.1 | *DJ-1 β* mutant and rotenone-treated flies exhibit alterations in carbohydrate levels

Although the cause of PD is still unknown, several studies suggest that metabolic alterations might play an important role in developing the disease.⁴ Indeed, we have recently demonstrated that *DJ-1 β* mutant flies displayed an increased glycolytic rate as well as changes in the levels of several metabolites when compared with controls.^{6,7} Among them, we found an important increase in trehalose levels, which is the main circulating sugar in the *Drosophila* hemolymph.^{7,38} To detect additional alterations in carbohydrate levels, we decided to quantify soluble carbohydrates and glycogen in our fPD model flies. Our results showed that 15-day-old *DJ-1 β* mutants have increased levels of both (Figure 1A,B). Interestingly, we found that 15-day-old *DJ-1 β* mutants also exhibited reduced weight compared with control flies (Figure 1C). Weight loss is often associated with an increase of energy expenditure, which could be explained by a switch from tricarboxylic acid (TCA) cycle to glycolysis.^{39,40} In fact, recent studies from our group have confirmed this switch, since fPD model flies showed increased glycolytic rate and reduced activity of several enzymes of the TCA cycle.^{6,7}

Subsequently, we analyzed whether rotenone-treated flies, a well-established *Drosophila* SPD model,⁴¹ showed similar phenotypes to *DJ-1 β* mutants. Indeed, we found that these flies also exhibited changes in carbohydrate metabolism when compared with vehicle-treated flies (DMSO), reflected by increased soluble carbohydrates and glycogen levels (Figure 1D,E). In addition, rotenone-treated flies showed reduced weight (Figure 1F). Taken together, our results indicated that both fPD and SPD model flies displayed alterations in carbohydrate metabolism.

3.2 | T2DM model flies display alterations in carbohydrate metabolism

High blood glucose level is a T2DM hallmark.⁴² Excitingly, several studies have revealed the existence of an association between T2DM and PD.^{16,17} While epidemiological links between both diseases have been deeply described, the underlying pathways and common mechanisms remain still unresolved.⁴³ In such a scenario, we decided to investigate the molecular and phenotypic links between T2DM and PD in *Drosophila*. Several *Drosophila* models for human T2DM have been described.³¹ Among them, we used a diet-induced T2DM model in which wild-type flies were fed with a medium containing six times more sugar (HSD) than control medium (ND). A previous report showed that those flies developed insulin resistance, which is a hallmark of T2DM.³² To determine whether HSD-fed adult flies exhibited T2DM-related phenotypes we first measured carbohydrate levels. Our results indicated that 15-day-old T2DM model flies displayed increased soluble carbohydrates and glycogen levels (Figure 2A,B). Subsequently, we found that these

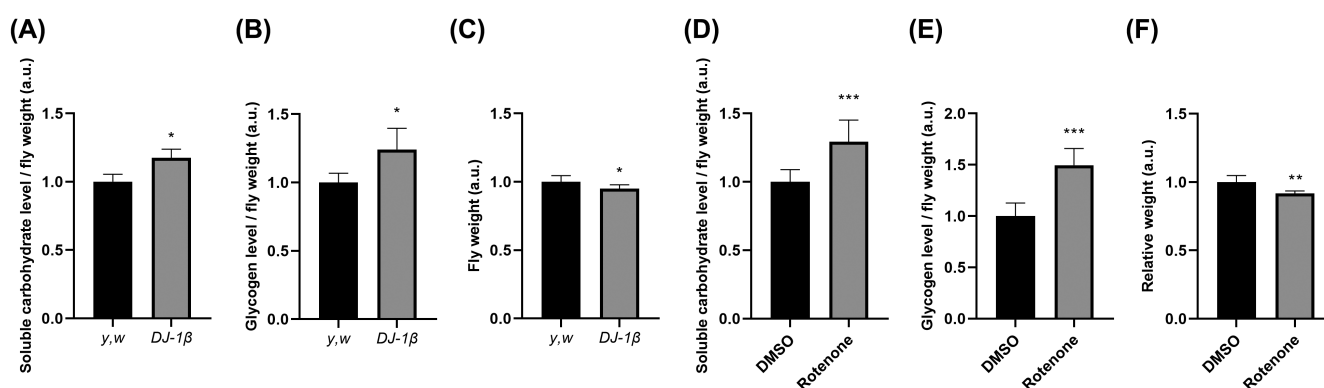


FIGURE 1 Metabolic alterations in PD model flies. (A,B) Soluble carbohydrate and glycogen levels in 15-day-old *DJ-1 β* -mutant flies were analyzed using the anthrone method by absorbance. (C) Fly weight of 15-day-old *DJ-1 β* mutant flies. (D,E) Soluble carbohydrate and glycogen levels in 15-day-old rotenone-treated flies were analyzed using the anthrone method by absorbance. (F) Fly weight of 15-day-old rotenone-treated flies. Results were normalized to data obtained in y,w control flies in A–C; and to data obtained in flies cultured in control medium (DMSO) in D–F. Error bars show SD from three replicates and three independent experiments in A, B, D, and E; and from at least six independent experiments in C and F (* $p < .05$; ** $p < .01$; *** $p < .001$).

flies presented increased expression of *ILP2*, a gene encoding one of the three ILPs related to glycemia control²⁹ (Figure 2C), thus confirming the existence of insulin resistance.²⁸ In addition, we analyzed the expression of three genes encoding ISP components like *InR*, *PI3K*, and *chico*. Our results showed that T2DM model flies exhibited increased the expression of those genes (Figure 2D), indicative of pathway activity reduction.²⁸ Taken together, increased levels of carbohydrates, the presence of insulin resistance, and decreased ISP activity validated flies fed with a HSD as a *Drosophila* T2DM model.

3.3 | T2DM and PD model flies present common phenotypes

As indicated above, multiple studies highlight the link between PD and T2DM. Indeed, both diseases exhibit common phenotypes such as mitochondrial dysfunction.¹⁴ To confirm this relation in our *Drosophila* models, we aimed to test whether T2DM model flies could present phenotypes similar to those observed in *DJ-1 β* mutants. Mitochondria are the main ROS producers, and their dysfunction leads to increased OS levels.⁴⁴ In fact, previous studies showed that *DJ-1 β* mutant flies displayed elevated OS levels as well as alterations in antioxidant enzymes.^{25,26} Hence, we decided to study OS levels in wild-type HSD-fed flies compared with controls (ND-fed flies). Our results demonstrated that 15-day-old T2DM model flies showed an increase in protein carbonylation levels (an OS marker) (Figure 3A). In addition, it has been recently reported that mitochondrial alterations in *DJ-1 β* mutant flies led to a reduction of ATP levels.⁷ Consequently, glycolysis was enhanced in PD model flies in order to counteract the loss of energy production.^{6,45} Likewise, we have found that 15-day-old T2DM model flies presented a reduction of ATP levels (Figure 3B), probably due to mitochondrial dysfunction. In addition, increased activity of hexokinase (Hk), phosphofructokinase (Pfk), and pyruvate kinase (Pk), enzymes involved in key regulatory steps of the glycolysis was observed in these flies (Figure 3C), suggesting an increased glycolytic rate. Moreover, we also found that T2DM flies presented reduced weight (Figure 3D), likely due to an enhanced glycolytic activity as suggested for *DJ-1 β* mutants. In relation with this, it has been found that other invertebrate T2DM models also presented decreased weight, which was associated with a reduction of food intake; however, the total amount of calories ingested by T2DM model animals was higher than that by controls. Therefore, it was suggested that weight loss might be caused by alterations in the mechanisms implicated in tissue growth.^{28,46}

On the other hand, T2DM is also considered as a risk factor of developing PD.¹⁴ Among the most typical

PD-related phenotypes exhibited by *DJ-1 β* mutant flies, we found locomotor alterations and reduced life span.^{25,26}

In order to determine if T2DM might trigger PD onset, we decided to study these phenotypes in wild-type HSD-fed flies compared with controls (ND-fed flies). Our results demonstrated that 15-day-old T2DM model flies have a reduced life span (Figure 4A). Besides, we found that flies fed with a HSD displayed locomotor deficits at 28 days of age, although no defects were found in younger flies (Figure 4B). It was reported that motor symptoms appear in PD when there is approximately 50%–60% of DA neuron loss.⁴⁷ Therefore, we decided to quantify levels of tyrosine hydroxylase (TH), a DA neurons marker, in T2DM model flies brain extracts to monitor DA neuron alterations. For doing so, we performed western-blot analysis with 28-day-old T2DM model flies heads with an anti-TH antibody. Interestingly, previous works have demonstrated that several PD models are able to develop PD-related phenotypes without exhibiting DA neurons loss. The presence of DA neuron disturbances was confirmed in those models, hence suggesting that these phenotypes might be probably appearing by alterations in DA neurons function.^{48–50} However, another study reported that DA neuron content in fly brains is related to TH levels.⁵¹ Our results showed that TH levels were, in fact, reduced in 28-day-old T2DM model flies (Figures 4C and S1); hence, suggesting DA neuron loss or dysfunction in these flies. Taken together, our results validated the link between PD and T2DM in *Drosophila* models and supported PD development in T2DM.

3.4 | *DJ-1*-deficiency leads to alterations in carbohydrate homeostasis

Several studies have demonstrated that modeling T2DM with HSD-fed animals resulted in increased OS levels, likely caused by high glucose concentration.⁵² Interestingly, besides the already known antioxidant effect of the DJ-1 protein, there is growing evidence that it might also play an important role in metabolism.^{7,53} Therefore, it is plausible that loss of *DJ-1* function could be detrimental under hyperglycemic conditions. To confirm this, *DJ-1 β* mutant flies were fed with a HSD during 15 days. Our results showed that they presented increased soluble carbohydrates as well as glycogen levels (Figure 5A,B). To determine whether *DJ-1 β* could play a significant role in their homeostasis, we studied if the increase of soluble carbohydrate and glycogen levels was affected by the HSD compared with ND (HSD/ND) in PD model and control flies. Our results showed that the increase of glycogen levels in HSD/ND was higher in *DJ-1 β* mutant flies than in controls, while no differences

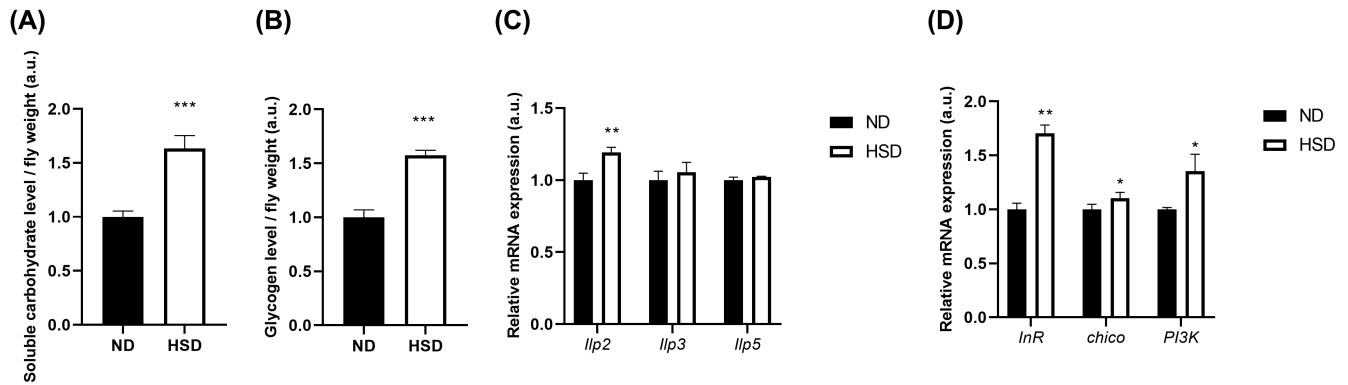


FIGURE 2 Metabolic alterations in T2DM model flies. (A,B) Soluble carbohydrate and glycogen levels in 15-day-old T2DM model flies (HSD) and flies fed with ND were analyzed using the anthrone method by absorbance. (C,D) Expression levels of *Ilp2*, *Ilp3*, and *Ilp5* genes and of genes of the ISP in 15-day-old T2DM model flies were analyzed by RT-qPCR. In all cases, results are expressed as arbitrary units (a.u.) and are normalized to data obtained in flies cultured in ND. Error bars show SD from three replicates and three independent experiments in A and B, and from four independent experiments in C and D (** $p < .01$; *** $p < .001$).

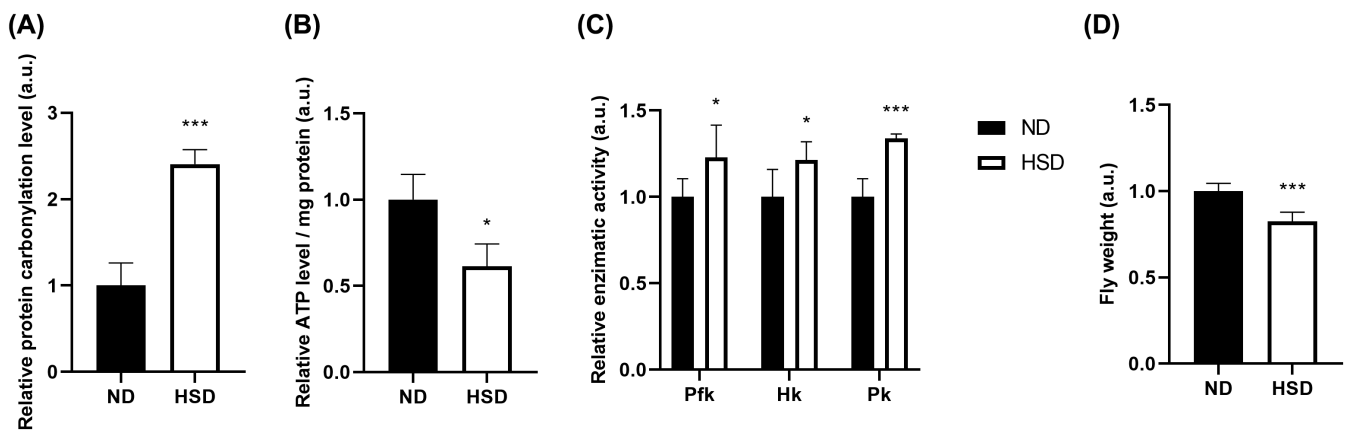


FIGURE 3 PD and T2DM phenotypes in T2DM model flies. (A) Protein carbonylation levels in T2DM model flies were analyzed by absorbance. Data were expressed as arbitrary units (a.u.) per mg of protein, and results were referred to data obtained in flies fed with ND (B) ATP levels in T2DM model flies were analyzed using the ATP Determination Kit (Invitrogen). (C) Activity of hexokinase (Hk), phosphofructokinase (Pfk), and pyruvate kinase (Pk) in T2DM model flies. (D) Fly weight of T2DM model flies. Results were normalized to data obtained in flies fed with ND. Error bars show SD from three replicates and three independent experiments in A–C, and from at least six independent experiments in D (* $p < .05$; *** $p < .001$).

were found in the increase of soluble carbohydrates (Figure 5C,D). This suggests that *DJ-1 β* may play an important role in glycogen metabolism. It has been reported that hyperglycemia increases OS levels.⁵² Since *DJ-1 β* mutants were shown to be hypersensitive to OS conditions (induced by paraquat, rotenone, H₂O₂, etc.),^{26,35,54} we analyzed if feeding PD model flies with a HSD had detrimental effects on motor ability. Accordingly, *DJ-1 β* mutant flies cultured in those conditions displayed motor defects from day 7 (Figure 5E), while controls fed with the same diet showed reduced motor ability at day 28 (Figure 4B). These results confirm that *DJ-1 β* mutant flies are more sensitive to increased carbohydrate levels, supporting an important role of *DJ-1 β* in carbohydrate metabolism.

3.5 | High glucose levels trigger neurodegeneration in mice and SH-SY5Y human cells

To further study the relevance of T2DM on PD development, we decided to use a T2DM mouse model. We used a well-established mouse T2DM model induced by 12 weeks of HFD which leads to high blood glucose levels.³³ As in the T2DM model flies, we found that 10-month-old female mice fed with HFD showed a TH expression reduction in brains when compared with ND-fed mice (Figures 6 and S2). These results supported the onset of PD in these mice. Similar results have been obtained in other T2DM mouse models.^{20,55,56}

To date, the cause by which T2DM might be triggering PD development remains unclear. The potential causes

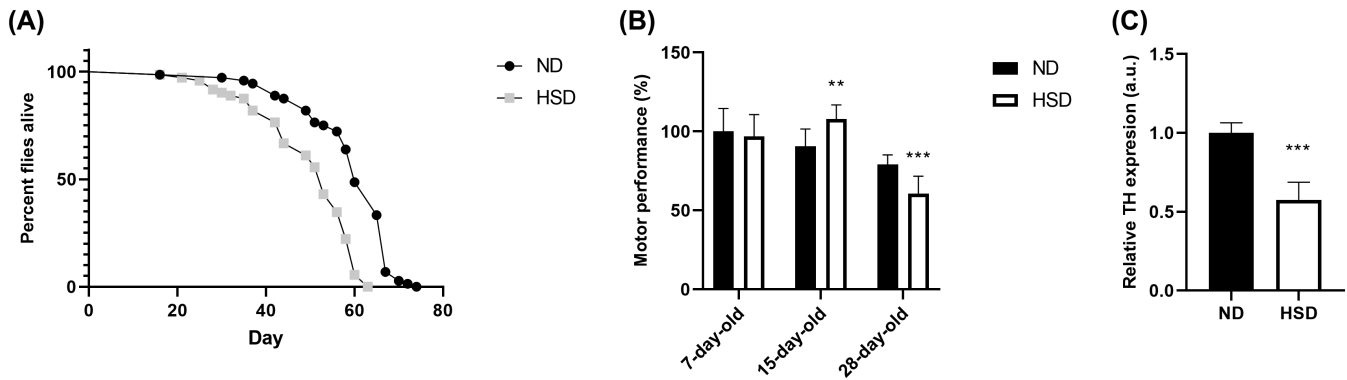


FIGURE 4 PD-related phenotypes in T2DM flies. (A) Comparison of survival curves of flies fed with HSD and ND. The significance of differences between survival curves was analyzed using Kaplan–Meier log-rank statistical test ($***p < .001$). (B) Motor performance of flies fed with HSD and ND at different ages was evaluated performing a climbing assay, and results were normalized to data obtained in 7-day-old flies fed with ND. Statistical values were obtained by comparing flies of the same age cultured in the different diets. (C) Graphical representation of TH protein levels in T2DM flies. α -tubulin was used as loading control. Results are referred to data obtained in flies fed with in ND and are expressed as arbitrary units (a.u.). Error bars show SD from three replicates and three independent experiments ($**p < .01$; $***p < .001$).

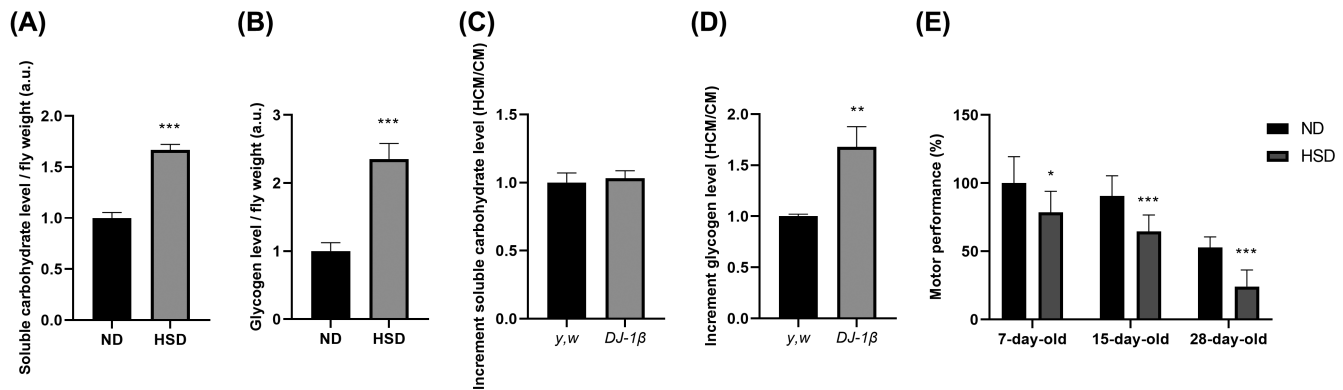


FIGURE 5 Effect of a HSD in PD model flies. (A,B) Soluble carbohydrate and glycogen levels in *DJ-1β* mutant flies fed with HSD and ND were analyzed using the anthrone method by absorbance. Results are expressed as arbitrary units (a.u.) per fly weight. (C,D) Increment of soluble carbohydrates and glycogen levels of *y,w* (control) and *DJ-1β*-mutant flies when fed with HSD compared with those flies fed with ND. (E) Motor performance of *DJ-1β* mutant flies fed with HSD and ND at different ages was evaluated performing a climbing assay and results were normalized to data obtained in 7-day-old flies fed with ND. Statistical values were obtained by comparing flies of the same age cultured in the different diets. In all cases, error bars show SD from three independent experiments in which three biological replicates were used ($*p < .05$; $**p < .01$; $***p < .001$).

described are vascular defects, increased levels of methylglyoxal, OS, or glucose.^{14,20,57} Since antidiabetic drugs (compounds able to reduce glucose levels) are being found as potential PD treatments,²⁰ we aimed to study if elevated glucose levels might be detrimental for neuron-like SH-SY5Y cells. To do this, we treated these cells with increased glucose concentrations in a range of 50–175 mM⁵⁸ and subsequently performed MTT viability assays. Our results indicated that viability was significantly reduced 100 mM glucose onwards (Figure 7A), hence confirming the toxic effect of high glucose levels in these cells. Subsequently, to study the molecular mechanism by which glucose might be producing cell death, we decided to measure the activation of the pro-apoptotic factor JNK^{59–61} after glucose treatment. We found that cells treated with 125 mM glucose

showed increased JNK phosphorylation levels when compared with cells treated with vehicle (Figures 7B and S3), which ultimately leads to cell death. Together, results obtained in the T2DM mouse model and in neuron-like SH-SY5Y human cells supported the relevance of high sugar levels in neuronal degeneration.

3.6 | Metformin ameliorates phenotypes in *DJ-1*-deficient human cells and T2DM model flies

Given the growing evidence of the relationship between PD and T2DM, antidiabetic drugs are being considered as promising PD therapies.^{14,17,20} Interestingly, a pilot screen

carried out by our group in *DJ-1* β mutant flies identified metformin as a candidate therapeutic compound for PD, being able to suppress motor defects in PD model flies.³⁷ Metformin (MET) is a well-known antidiabetic drug. However, it has been also reported to exert a neuroprotective effect through the 5'-adenosine mono-phosphate-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway.⁶² Therefore, we aimed to confirm this compound efficiency as PD therapeutic. First, we decided to determine whether

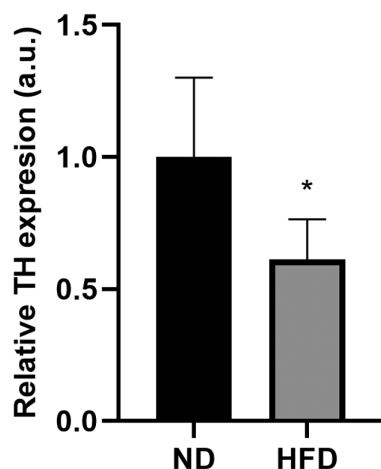


FIGURE 6 Tyrosine hydroxylase expression in T2DM mouse model brain. Graphical representation of TH protein levels in T2DM mouse brain. B-Actin was used as loading control. Results are referred to data obtained in mice fed with ND and are expressed as arbitrary units (a.u.). Error bars show SD from five independent experiments (* $p < .05$).

MET was able to affect viability of our cell PD model based on *DJ-1* deficiency.³⁷ We found that MET increased viability in *DJ-1*-deficient SH-SY5Y cells in a dose-dependent manner, being 50 μ M the most effective concentration (Figure S4). Subsequently, we tested if this compound was able to suppress DM as well as PD phenotypes in T2DM model flies. We found that HSD-fed flies treated with MET presented reduced levels of soluble carbohydrates and glycogen when compared with flies treated with DMSO as vehicle (Figure 8A,B), hence confirming its antidiabetic activity. Subsequently, we also demonstrated that MET was able to suppress typical PD phenotypes, by reducing protein carbonylation levels (Figure 8C), and improving locomotor activity of these flies (Figure 8D). Accordingly, MET also increased TH expression in T2DM model flies (Figures 8E and S1), which correlates with a reduction of DA neurodegeneration. These results confirm that MET might be a promising candidate therapeutic for PD.

4 | DISCUSSION

The increase in life expectancy is leading to an increase in age-associated diseases, like PD and DM,¹⁶ causing important social as well as economic burdens.^{63,64} PD prevalence increases with age and affects 1%–3% of the population over 60 years.¹ As for DM, it has a prevalence of 8.8% in the group of population between 20 and 79 years in 2017.⁶⁴ In addition, an increase in the number of cases of both diseases is expected in the future.^{63,64} Interestingly,

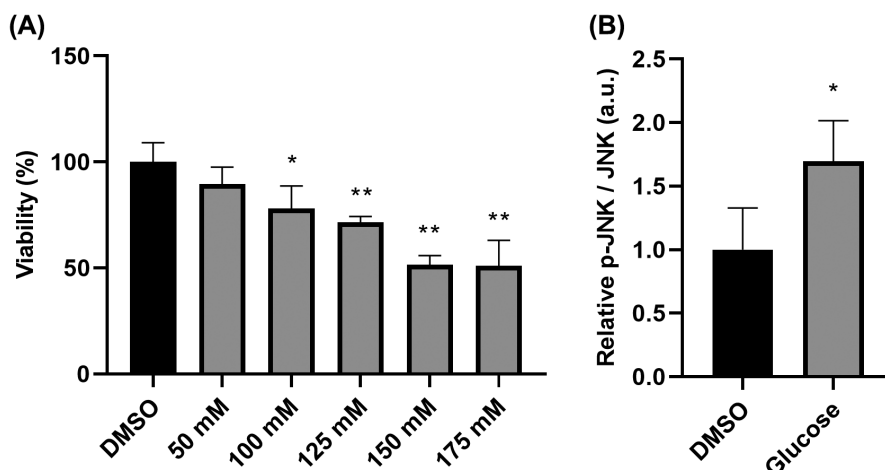


FIGURE 7 Effect of glucose on viability and JNK pathway activity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. (A) Cell viability was measured in SH-SY5Y neuroblastoma cells treated with different concentrations of glucose (50–175 mM) or vehicle (DMSO), using an MTT assay. Results were normalized to data obtained in vehicle-treated cells (DMSO). (B) Antibodies against JNK and p-JNK were used to detect proteins of interest in SH-SY5Y cells treated with vehicle medium (DMSO) or 125 mM glucose by Western blot. The relative ratio of p-JNK/JNK was analyzed by densitometry. Results are referred to data obtained in vehicle-treated cells and expressed as arbitrary units (a.u.). Error bars show SD from three independent experiments in which three biological replicates were used in A and from four biological replicates in B (* $p < .05$; ** $p < .01$).

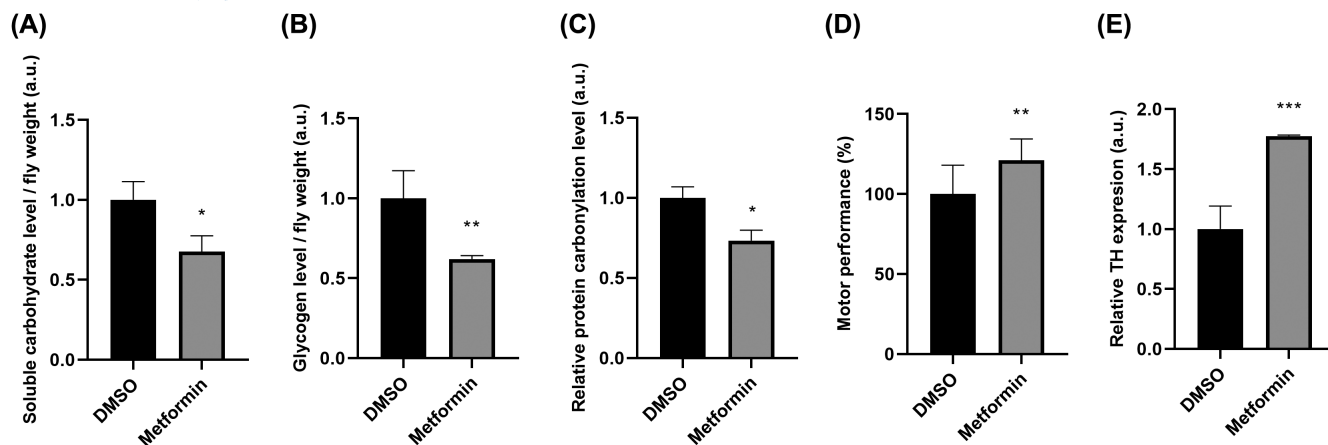


FIGURE 8 Effect of metformin in T2DM model flies. (A,B) Levels of soluble carbohydrates and glycogen in T2DM model flies treated with 25 mM MET were analyzed using the anthrone method by absorbance. Results are expressed as arbitrary units (a.u.) per fly weight and are normalized to data obtained in flies treated in vehicle medium (DMSO). (C) Protein carbonylation levels in T2DM model flies treated with 25 mM MET were analyzed by absorbance. Data were expressed as arbitrary units (a.u.) per mg of protein and results were referred to data obtained in T2DM flies treated with vehicle medium (DMSO). (D) Motor performance of T2DM model flies treated with 25 mM MET or DMSO was evaluated performing a climbing assay and results were normalized to data obtained in flies treated with vehicle medium (DMSO). (E) Tyrosine hydroxylase (TH) levels in T2DM model flies treated with 25 mM MET. Representative western blots are shown on upper panel. α -tubulin was used as control. A graphical representation of protein levels is shown on lower panel. Results are referred to data obtained in T2DM model flies treated with vehicle (DMSO) and are expressed as arbitrary units (a.u.). In all cases, error bars show SD from three replicates and three independent experiments (* $p < .05$; ** $p < .01$).

recent epidemiological studies suggest that T2DM and PD are probably related.¹⁶ In particular, most of them demonstrated that T2DM is a risk factor of developing PD and could worsen cognition in PD patients.¹⁴ Accordingly, an increase in ISP activity was reported to improve motor and cognitive abilities, and to exert neuroprotective effects in PD patients.¹⁷ Besides, alterations found in chronic T2DM patients, like microvascular complications, may lead to nephropathy, retinopathy, and neuropathy.²⁷ However, it was also proposed that neuropathy might be produced in T2DM by other mechanisms, such as hyperglycemia.⁵⁷ Regarding this, we recently showed that *DJ-1* β mutant flies presented higher levels of trehalose, the main circulating sugar in the *Drosophila* hemolymph.^{7,38} Accordingly, we demonstrated in this work that these fPD model flies also present higher levels of soluble carbohydrates as well as glycogen, as also found in sPD model flies. Therefore, it is worth to consider that elevated carbohydrate levels might exert a detrimental role in developing PD.

In such a scenario, and to investigate the consequences of hyperglycemia and its relationship with PD, we used *Drosophila* as a model. *Drosophila* is a useful model to study T2DM due to the conservation of ISP between flies and humans.³⁰ In this work, we have used a diet-induced T2DM *Drosophila* model in which wild-type flies were fed with a HSD. T2DM model flies were reported to present higher levels of glucose than flies fed with ND, and to develop insulin resistance.^{30,32,65} Accordingly, our results showed that T2DM model flies exhibited high levels of

soluble carbohydrates as well as glycogen. Additionally, we also confirmed that T2DM model flies showed a reduction of ISP activity and an increase of *ILP2* expression, which along with the increase of carbohydrate levels are hallmarks of T2DM. Our results also showed that HSD-fed flies were smaller than those fed with ND, which could be explained by an increase of energy expenditure caused by the switch of metabolism from TCA to glycolysis.^{39,40} This assumption was confirmed by finding increased activity of key enzymes of the glycolytic pathway in such flies. Moreover, mitochondrial defects have been reported in T2DM models,¹⁴ which suggests a reduction in TCA activity. Excitingly, this work confirmed that ATP levels were also reduced in T2DM model flies. The finding of common phenotypes in T2DM model flies and *DJ-1* β mutants clearly supports the relationship between both diseases.^{6,7}

Many studies have been recently performed to evaluate the link between PD and T2DM. In fact, most of the epidemiological studies conclude that there is an important risk of developing PD in T2DM patients, although there are also contradictory results.¹⁶ It was also reported that hyperglycemia increases OS levels⁵² and promotes proteins glycation, which leads to their aggregation.¹⁴ Moreover, it has been shown that insulin plays an important role in the central nervous system, since neurons use glucose as the main energy substrate,^{19,20} acts as a pro-survival factor, and regulates mitochondrial homeostasis.¹⁶ Overall, these results support that T2DM is a risk factor of developing PD. Here, we have

confirmed that T2DM model flies exhibited PD-related phenotypes like reduced lifespan, locomotor defects but also DA neuron disturbances (inferred by reduced TH levels), which is a pathological hallmark of PD. According to our results in *Drosophila*, we have also shown that alterations in DA neurons are evident in a T2DM mouse model. Interestingly, DA neurodegeneration as well as motor defects has been reported in other T2DM animal models,^{20,55,56,66} hence supporting our findings. Several mechanisms have been proposed to explain neurodegeneration like vascular defects, increased methylglyoxal levels, OS or increased glucose levels.^{14,20,57} Here, we demonstrated that viability in SH-SY5Y neuroblastoma cell was impaired by high glucose levels (as previously reported in Ref. [58]), which triggered the apoptotic pathway by promoting JNK phosphorylation. Therefore, our results confirm that elevated glucose levels play a detrimental role in neuronal survival.

DJ-1 is a multifunctional protein, mainly acting as antioxidant. However, it also plays important roles in metabolism and mitochondrial homeostasis.^{53,67} In mammals, insulin is produced in pancreatic β -cells,⁶⁸ which are hypersensitive to OS since they express reduced levels of antioxidant proteins.⁶⁹ Besides, mitochondrial integrity and functionality preserves β -cells function and insulin secretion.⁶⁹ Interestingly, it was shown that *DJ-1* is upregulated under hyperglycemic conditions, and that DJ-1 levels are reduced in pancreatic islets of T2DM patients.⁶⁹ Therefore, *DJ-1* might play an important role in maintaining pancreatic β -cells homeostasis. In *Drosophila*, insulin is produced and secreted by specialized neurons, known as insulin-producing cells.²⁷ Therefore, it would be interesting to determine if those *Drosophila* cells present similar characteristics than human pancreatic β -cells, and if *DJ-1 β* plays an important role in their homeostasis. Since hyperglycemic conditions might result in an increase of OS levels, PD models based on *DJ-1* deficiency could be more sensitive to those conditions. In fact, it was reported that *DJ-1*-deficient mice showed glucose intolerance and reduced β -cell area, and were more sensitive to streptozotocin treatment, a chemical that induces inflammatory β -cells stress and leads to cell death.^{69,70} In the present study, we have found that *DJ-1 β* mutant flies fed with a HSD presented increased levels of soluble carbohydrates and glycogen as well as motor defects at an earlier age than those fed with ND. We have also shown that the increase of glycogen levels was higher in PD model than in control flies when fed with a HSD, thus suggesting that loss of *DJ-1* function might produce alterations in glycogen metabolism. In fact, it was shown that hyperglycemia enhances the expression of genes involved in glycogen

synthesis, such as *glycogen synthase*, and that glycogen levels can be related to alterations in β -cell metabolism.⁷¹

Since T2DM and PD exhibit common phenotypes such as mitochondrial alterations, increased levels of OS markers, neuroinflammation as well as ER stress,^{14,18} compounds addressed to restore these phenotypes might be useful for treating both diseases.¹⁴ In fact, antidiabetic drugs such as PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) agonists, GLP-1 (glucagon-like peptide-1) receptor agonists, and MET are being considered as promising drugs for treating PD.^{14,17} In addition, there are several clinical trials to repurpose antidiabetic drugs in PD patients.²⁰ Besides, a recent study has indicated that T2DM patients treated with antidiabetic drugs showed reduced PD incidence.¹⁶ Excitingly, a pilot screening assay carried out by our group identified MET as a compound able to improve motor performance in *DJ-1 β* mutant flies.³⁷ Furthermore, it has been shown that MET also prevents cell death in another mouse model for T2DM.⁷² In this work, we have validated MET as a candidate compound for PD by confirming its effectiveness increasing viability in *DJ-1*-deficient cells. Besides, we have shown that MET is also able to suppress DM and PD-related phenotypes in T2DM flies. First, we have demonstrated that 15-day-old T2DM flies treated with MET showed reduced levels of soluble carbohydrates as well as glycogen, hence confirming its antidiabetic effect. Subsequently, we have shown that MET is able to reduce protein carbonylation in 15-day-old T2DM model flies to improve motor performance and to reduce DA neurodegeneration in 28-day-old T2DM flies. Additional studies have highlighted the neuroprotective effects of MET. For example, it was reported that MET increased cell viability through the activation of the AMPK pathway, as well as promoted autophagy and reduced microglial activation in a MPTP mouse PD model.⁷² Besides, it has been recently found that MET was able to reduce mitochondrial hyperactivity, an alteration that leads to neurodegeneration in a *C. elegans* PD model.⁷³

In summary, we have used *DJ-1 β* mutant flies, well-established *Drosophila* and mouse T2DM models, and neuron-like human cells to investigate the link between PD and T2DM. Our results demonstrated that fly models exhibit common phenotypes such as carbohydrate levels alterations, dysfunction in metabolic pathways related to energy production, and increased OS levels. In addition, we have shown that T2DM model flies develop PD-related symptoms with age, and that hyperglycemia might be one of the causes that triggers DA neurodegeneration in T2DM, both in fly and mammalian models. Interestingly, our results showed that MET, an antidiabetic drug, suppressed PD-related phenotypes

in T2DM model flies. Besides, it also enhances cell viability in *DJ-1*-deficient human cells, thus supporting its use as a candidate PD therapeutic. Taken together, our results demonstrate the link between both diseases, and validate antidiabetic drugs as potential PD treatments. Finally, we have confirmed that *DJ-1 β* mutant flies are more vulnerable to hyperglycemic conditions. Therefore, we propose that loss of *DJ-1* function could exert a detrimental effect in T2DM, being able to accelerate PD development in T2DM patients. Further experiments will be required to confirm this hypothesis.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Nuria Paricio, Silvia Muñoz-Descalzo, and Francisco José Sanz conceived and designed the research; Francisco José Sanz, Cristina Solana-Manrique, Joaquín Lilao-Garzón, and Yeray Brito-Casillas performed the research and acquired the data; Francisco José Sanz, Cristina Solana-Manrique, and Joaquín Lilao-Garzón analyzed and interpreted the data. All authors were involved in drafting and revising the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Dr. Jongkyeong Chung and the Bloomington Drosophila Stock Center for providing fly stocks. Research at the NP lab is supported by the University of Valencia (Programa de Acciones Especiales de Investigación, UV-INV-AE-1553209). SMD is supported by the “Viera y Clavijo” Program from the Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (ACIISI) and the ULPGC and JLG by the ULPGC predoctoral program. Research at the SMD lab is supported by the ACIISI (CEI2019-02), Programa de Ayudas a la Investigación de la ULPGC, and ACIISI co-funded by FEDER Funds (ProID2020010013). Open access funding enabled and organized by ProjektDEAL.

DISCLOSURES

The authors declare no conflicts of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

ORCID

Nuria Paricio  <https://orcid.org/0000-0001-7193-2532>

REFERENCES

1. Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm.* 2017;124(8):901-905.
2. Xiong Y, Yu J. Modeling Parkinson's disease in drosophila: what have we learned for dominant traits? *Front Neurol.* 2018;9:228.
3. Athauda D, Foltynie T. Challenges in detecting disease modification in Parkinson's disease clinical trials. *Parkinsonism Relat Disord.* 2016;32:1-11.
4. Anandhan A, Jacome MS, Lei S, et al. Metabolic dysfunction in Parkinson's disease: bioenergetics, redox homeostasis and central carbon metabolism. *Brain Res Bull.* 2017;133:12-30.
5. Maiti P, Manna J, Dunbar GL, Maiti P, Dunbar GL. Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson's disease: targets for potential treatments. *Transl Neurodegener.* 2017;6(1):28.
6. Solana-Manrique C, Sanz FJ, Ripollés E, et al. Enhanced activity of glycolytic enzymes in drosophila and human cell models of Parkinson's disease based on DJ-1 deficiency. *Free Radic Biol Med.* 2020;158:137-148.
7. Solana-Manrique C, Sanz FJ, Torregrosa I, et al. Metabolic alterations in a drosophila model of Parkinson's disease based on DJ-1 deficiency. *Cell.* 2022;11:331.
8. Sonninen TM, Hämäläinen RH, Koskivi M, et al. Metabolic alterations in Parkinson's disease astrocytes. *Sci Rep.* 2020;10(1):14474.
9. Bandres-Ciga S, Diez-Fairen M, Kim JJ, Singleton AB. Genetics of Parkinson disease: an introspection of its journey towards precision medicine. *Neurobiol Dis.* 2020;137:104782.
10. Chai C, Lim KL. Genetic insights into sporadic Parkinson's disease pathogenesis. *Curr Genomics.* 2013;14(8):486-501.
11. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science.* 2003;299(5604):256-259.
12. Strobbe D, Robinson AA, Harvey K, Rossi L, et al. Distinct mechanisms of pathogenic DJ-1 mutations in mitochondrial quality control. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:68.
13. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2013;36(suppl 1):S67-S74.
14. Hassan A, Kandel RS, Mishra R, Gautam J, Alaref A, Jahan N. Diabetes mellitus and Parkinson's disease: shared pathophysiological links and possible therapeutic implications. *Cureus.* 2020;12(8):e9853.
15. Khan MAB, Hashim MJ, King JK, et al. Epidemiology of type 2 diabetes—global burden of disease and forecasted trends. *J Epidemiol Glob Health.* 2020;10(1):107-111.
16. Fiory F, Perruolo G, Cimmino I, et al. The relevance of insulin action in the dopaminergic system. *Front Neurosci.* 2019;13:868.
17. Sharma T, Kaur D, Grewal AK, Singh TG. Therapies modulating insulin resistance in Parkinson's disease: a cross talk. *Neurosci Lett.* 2021;749:135754.
18. Rocha KMA, da Silva Goulart A, Costa MT, Salgueiro ACF, Folmer V. The role of type 2 diabetes mellitus as a risk factor for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Res Soc Dev.* 2021;10(1):e23410111673.
19. Hong CT, Chen KY, Wang W, et al. Insulin resistance promotes Parkinson's disease through aberrant expression of α -synuclein, mitochondrial dysfunction, and deregulation of the polo-like kinase 2 signaling. *Cell.* 2020;9(3):740.
20. Renaud J, Bassareo V, Beaulieu J, et al. Dopaminergic neurodegeneration in a rat model of long-term hyperglycemia: preferential degeneration of the nigrostriatal motor pathway. *Neurobiol Aging.* 2018;69:117-128.
21. Lilao-Garzón J, Valverde-Tercedor C, Muñoz-Descalzo S, Brito-Casillas Y, Wägner AM. In vivo and in vitro

- models of diabetes: a focus on pregnancy. *Adv Exp Med Biol.* 2021;1307:553-576.
22. McGurk L, Berson A, Bonini NM. *Drosophila* as an in vivo model for human neurodegenerative disease. *Genetics.* 2015;201(2):377-402.
 23. Muñoz-Soriano V, Paricio N. *Drosophila* models of Parkinson's disease: discovering relevant pathways and novel therapeutic strategies. *Parkinsons Dis.* 2011;2011:520640.
 24. Casani S, Gómez-Pastor R, Matallana E, Paricio N. Antioxidant compound supplementation prevents oxidative damage in a *drosophila* model of Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med.* 2013;61:151-160.
 25. Lavara-Culebras E, Muñoz-Soriano V, Gómez-Pastor R, Matallana E, Paricio N. Effects of pharmacological agents on the lifespan phenotype of *drosophila* DJ-1 β mutants. *Gene.* 2010;462(1-2):26-33.
 26. Lavara-Culebras E, Paricio N. *Drosophila* DJ-1 mutants are sensitive to oxidative stress and show reduced lifespan and motor deficits. *Gene.* 2007;400(1-2):158-165.
 27. Álvarez-Rendón JP, Salceda R, Riesgo-Escovar JR. *Drosophila melanogaster* as a model for diabetes type 2 progression. *Biomed Res Int.* 2018;2018:1417528.
 28. Pasco MY, Léopold P. High sugar-induced insulin resistance in *drosophila* relies on the lipocalin neural Lazarillo. *PLoS ONE.* 2012;7(5):e36583.
 29. Gálíková M, Klepsatel P. Obesity and aging in the *drosophila* model. *Int J Mol Sci.* 2018;19(7):1896.
 30. Teleman AA, Ratzenböck I, Oldham S. *Drosophila*: a model for understanding obesity and diabetic complications. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2012;120(4):184-185.
 31. Liguori F, Mascolo E, Verni F. The genetics of diabetes: what we can learn from *drosophila*. *Int J Mol Sci.* 2021;22(20):11295.
 32. Morris SNS, Coogan C, Chamseddin K, et al. Development of diet-induced insulin resistance in adult *Drosophila melanogaster*. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822(8):1230-1237.
 33. Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes.* 1988;37(9):1163-1167.
 34. Graham P, Pick L. *Drosophila* as a model for diabetes and diseases of insulin resistance. *Curr Top Dev Biol.* 2017;121:397-419.
 35. Park J, Sung YK, Cha GH, Sung BL, Kim S, Chung J. *Drosophila* DJ-1 mutants show oxidative stress-sensitive locomotive dysfunction. *Gene.* 2005;361(1-2):133-139.
 36. Foray V, Pelisson PF, Bel-Venner MC, et al. A handbook for uncovering the complete energetic budget in insects: the van Handel's method (1985) revisited. *Physiol Entomol.* 2012;37(3):295-302.
 37. Sanz FJ, Solana-Manrique C, Muñoz-Soriano V, Calap-Quintana P, Moltó MD, Paricio N. Identification of potential therapeutic compounds for Parkinson's disease using *drosophila* and human cell models. *Free Radic Biol Med.* 2017;108:683-691.
 38. Yasugi T, Yamada T, Nishimura T. Adaptation to dietary conditions by trehalose metabolism in *drosophila*. *Sci Rep.* 2017;7(1):1619.
 39. Liesa M, Shirihi OS. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab.* 2013;17(4):491-506.
 40. Wu R, Liu X-M, Su J-G, et al. DJ-1 maintains energy and glucose homeostasis by regulating the function of brown adipose tissue. *Cell Discov.* 2017;3:16054.
 41. Coulom H, Birman S. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci.* 2004;24(48):10993-10998.
 42. Zhang Y, Zhao H, Liu B, et al. Human serum metabolomic analysis reveals progression for high blood pressure in type 2 diabetes mellitus. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 2021;9(1):e002337.
 43. Cheong JLY, de Pablo-Fernandez E, Foltynie T, Noyce AJ. The association between type 2 diabetes mellitus and Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis.* 2020;10(3):775-789.
 44. Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Dmitriev AA, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget.* 2016;7(29):44879-44905.
 45. Requejo-Aguilar R, Lopez-Fabuel I, Jimenez-Blasco D, Fernandez E, Almeida A, Bolaños JP. DJ1 represses glycolysis and cell proliferation by transcriptionally upregulating pink1. *Biochem J.* 2015;467(2):303-310.
 46. Matsumoto Y, Sumiya E, Sugita T, Sekimizu K. An invertebrate hyperglycemic model for the identification of anti-diabetic drugs. *PLoS ONE.* 2011;6(3):e18292.
 47. Gallegos S, Pacheco C, Peters C, Opazo C, Aguayo LG. Features of alpha-synuclein that could explain the progression and irreversibility of Parkinson's disease. *Front Neurosci.* 2015;9:59.
 48. González-Rodríguez P, Zampese E, Stout KA, et al. Disruption of mitochondrial complex I induces progressive parkinsonism. *Nature.* 2021;599(7886):650-656.
 49. Navarro JA, Heßner S, Yenissetti SC, et al. Analysis of dopaminergic neuronal dysfunction in genetic and toxin-induced models of Parkinson's disease in *drosophila*. *J Neurochem.* 2014;131(3):369-382.
 50. Rose SJ, Harrast P, Donsante C, et al. Parkinsonism without dopamine neuron degeneration in aged l-dopa-responsive dystonia knockin mice. *Mov Disord.* 2017;32(12):1694-1700.
 51. Molina-Mateo D, Fuenzalida-Urbe N, Hidalgo S, et al. Characterization of a presymptomatic stage in a *drosophila* Parkinson's disease model: unveiling dopaminergic compensatory mechanisms. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863(11):2882-2890.
 52. Renaud J, Bournival J, Zottig X, Martinoli MG. Resveratrol protects DAergic PC12 cells from high glucose-induced oxidative stress and apoptosis: effect on p53 and GRP75 localization. *Neurotox Res.* 2014;25(1):110-123.
 53. Mencke P, Boussaad I, Romano CD, Kitami T, Linster CL, Krüger R. The role of dj-1 in cellular metabolism and pathophysiological implications for Parkinson's disease. *Cell.* 2021;10(2):347.
 54. Meulener M, Whitworth AJ, Armstrong-Gold CE, et al. *Drosophila* DJ-1 mutants are selectively sensitive to environmental toxins associated with Parkinson's disease. *Curr Biol.* 2005;15(17):1572-1577.
 55. Han J, Nepal P, Odelade A, et al. High-fat diet-induced weight gain, behavioral deficits, and dopamine changes in young C57BL/6J mice. *Front Nutr.* 2021;7:591161.
 56. Jang Y, Lee MJ, Han J, et al. A high-fat diet induces a loss of midbrain dopaminergic neuronal function that underlies motor abnormalities. *Exp Neurobiol.* 2017;26(2):104-112.
 57. Murillo-Maldonado JM, Sánchez-Chávez G, Salgado LM, Salceda R, Riesgo-Escovar JR. *Drosophila* insulin pathway mutants affect visual physiology and brain function besides growth, lipid, and carbohydrate metabolism. *Diabetes.* 2011;60(5):1632-1636.

58. Cho SJ, Kang KA, Piao MJ, et al. 7,8-dihydroxyflavone protects high glucose-damaged neuronal cells against oxidative stress. *Biomol Ther.* 2019;27(1):85-91.
59. Ambacher KK, Pitzul KB, Karajgikar M, Hamilton A, Ferguson SS, Cregan SP. The JNK- and AKT/GSK3 β - signaling pathways converge to regulate puma induction and neuronal apoptosis induced by trophic factor deprivation. *PLoS ONE.* 2012;7(10):e46885.
60. Sanz FJ, Solana-Manrique C, Torres J, Masiá E, Vicent MJ, Paricio N. A high-throughput chemical screen in DJ-1 β mutant flies identifies Zaprinast as a potential Parkinson's disease treatment. *Neurotherapeutics.* 2021;2021(1):1-14.
61. Zhang XL, Wang ZZ, Shao QH, et al. RNAi-mediated knock-down of DJ-1 leads to mitochondrial dysfunction via Akt/GSK-3 β and JNK signaling pathways in dopaminergic neuron-like cells. *Brain Res Bull.* 2019;146:228-236.
62. Paudel YN, Angelopoulou E, Piperi C, Shaikh MF, Othman I. Emerging neuroprotective effect of metformin in Parkinson's disease: a molecular crosstalk. *Pharmacol Res.* 2020;152:104593.
63. Afentou N, Jarl J, Gerdtham UG, Saha S. Economic evaluation of interventions in Parkinson's disease: a systematic literature review. *Mov Dis Clin Pract.* 2019;6(4):282-290.
64. Standl E, Khunti K, Hansen TB, Schnell O. The global epidemics of diabetes in the 21st century: current situation and perspectives. *Eur J Prev Cardiol.* 2019;26(suppl 2):7-14.
65. Birse RT, Choi J, Reardon K, et al. High fat diet-induced obesity and heart dysfunction is regulated by the TOR pathway in drosophila. *Cell Metab.* 2010;12(5):533-544.
66. Figlewicz DP, Brot MD, McCall AL, Szot P. Diabetes causes differential changes in CNS noradrenergic and dopaminergic neurons in the rat: a molecular study. *Brain Res.* 1996;736(1-2):54-60.
67. Ariga H, Takahashi-Niki K, Kato I, Maita H, Niki T, Iguchi-Ariga SMM. Neuroprotective function of DJ-1 in Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:683920.
68. Cao J, Ni J, Ma W, et al. Insight into insulin secretion from transcriptome and genetic analysis of insulin-producing cells of drosophila. *Genetics.* 2014;197(1):175-192.
69. Jain D, Jain R, Eberhard D, et al. Age- and diet-dependent requirement of DJ-1 for glucose homeostasis in mice with implications for human type 2 diabetes. *J Mol Cell Biol.* 2012;4(4):221-230.
70. Jain D, Weber G, Eberhard D, et al. DJ-1 protects pancreatic beta cells from cytokine- and streptozotocin-mediated cell death. *PLoS ONE.* 2015;10(9):e0138535.
71. Ashcroft FM, Rohm M, Clark A, Brereton MF. Is type 2 diabetes a glycogen storage disease of pancreatic β cells? *Cell Metab.* 2017;26(1):17-23.
72. Lu M, Su C, Qiao C, Bian Y, Ding J, Hu G. Metformin prevents dopaminergic neuron death in MPTP/P-induced mouse model of Parkinson's disease via autophagy and mitochondrial ROS clearance. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2016;19(9):pyw047.
73. Mor DE, Sohrabi S, Kaletsky R, et al. Metformin rescues Parkinson's disease phenotypes caused by hyperactive mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(42):26438-26447.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Sanz FJ, Solana-Manrique C, Lilao-Garzón J, Brito-Casillas Y, Muñoz-Descalzo S, Paricio N. Exploring the link between Parkinson's disease and type 2 diabetes mellitus in *Drosophila*. *The FASEB Journal.* 2022;36:e22432. doi: [10.1096/fj.202200286R](https://doi.org/10.1096/fj.202200286R)