

**AVALUACIÓ DEL POTENCIAL TERAPÈUTIC DE DOS
COMPOSTOS EN *DROSOPHILA MELANOGASTER* COM A
MODEL BIOMÈDIC DE LA MALALTIA DE PARKINSON**

Vallivana Piqueres Ortega

TREBALL FINAL DE GRAU BIOTECNOLOGIA

(Doble grau en Biotecnologia i Bioquímica i biologia molecular)

Tutor/a Acadèmic/a: Anna Ardévol Grau, Bioquímica i Biotecnologia
Universitat Rovira i Virgili de Tarragona, anna.ardevol@urv.cat

En cooperació amb la Facultat de Ciències Biològiques de la Universitat de València.

Supervisor/a: Nuria Paricio Ortiz, Departament de Genètica, Facultat de Ciències Biològiques de la Universitat de València, nuria.paricio@uv.es

CONTINGUTS

1. DADES DEL CENTRE	4
2. RESUM I PARAULES CLAU	5
3. INTRODUCCIÓ.....	6
3.1 La malaltia de Parkinson	6
3.1.1 Fisiopatologia, manifestacions clíniques, etiologia.....	6
3.1.2 Mecanismes moleculars de la malaltia de Parkinson	6
3.1.3 La proteïna DJ-1.....	8
3.2 Models preclínics per a l'estudi de la malaltia de Parkinson i ús de <i>Drosophila melanogaster</i> en la identificació de compostos amb potencial terapèutic front el Parkinson ...	9
3.2.1 Rastreig a gran escala de compostos amb potencial terapèutic front la malaltia de Parkinson.....	10
4. HIPÒTESI DEL TREBALL I OBJECTIUS	11
5. MATERIALS I MÈTODES	12
5.1 Soca de <i>Drosophila melanogaster</i>	12
5.2 Compostos d'estudi	12
5.3 Tractament de les soques de <i>Drosophila melanogaster</i> amb els compostos d'estudi.....	12
5.4 Quantificació dels nivells de H ₂ O ₂	13
5.5 Quantificació dels nivells de carbonilació de proteïnes	14
5.6 Quantificació dels nivells de GSH/GSSG	15
5.7 Determinació dels nivells d'ATP	15
5.8 Determinació dels nivells de glucogen i carbohidrats solubles.....	16
5.9 Anàlisi estadístic	17
6. RESULTATS	18
6.2 Avaluació de l'efecte terapèutic dels compostos d'estudi en l'estrès oxidatiu en el model de MP de <i>Drosophila melanogaster</i>	18
6.3 Avaluació de l'efecte terapèutic dels compostos d'estudi en la funció mitocondrial en el model de MP de <i>Drosophila melanogaster</i>	20
6.4 Avaluació de l'efecte terapèutic dels compostos d'estudi en el metabolisme de la glucosa en el model de MP de <i>Drosophila melanogaster</i>	21
7. DISCUSSIÓ	23
8. PERSPECTIVES FUTURES	27
9. CONCLUSIÓ.....	28
10. BIBLIOGRAFIA.....	29
11. AUTOAVALUACIÓ.....	32
12. ANNEX.....	33
AGRAÏMENTS	36

1. DADES DEL CENTRE

Aquests Treball Final de grau va ser dut a terme durant la meua estància de pràctiques externes del 3 de febrer al 5 de maig de 2025 al grup de recerca de Genètica Molecular del Desenvolupament i Models Biomèdics (GMDMB), que forma part del centre Institut Universitari de Biotecnologia i Biomedicina (BIOTECMED). Pertany al departament de Genètica de la Facultat de Ciències Biològiques (Bloc B, sisena planta) de la Universitat de València (UV); concretament al Campus de Burjassot, que es va crear oficialment en 1977 arran de la divisió de l'antiga Facultat de Ciències.

Al grup de recerca GMDMB, dirigit per la Dra. Nuria Paricio Ortiz, s'utilitzen models biomèdics, concretament *Drosophila melanogaster* i cèl·lules de neuroblastoma humà *SH-SY5Y*. D'aquesta manera, estudien malalties genètiques humanes, amb l'objectiu d'analitzar les seues rutes de patogènesi i identificar biomarcadors diagnòstics o de seguiment, així com descobrir molècules amb potencial terapèutic. També investiguen processos bàsics del desenvolupament de *D. melanogaster*, com el tancament dorsal embrionari o la polaritat epitelial, per la seua rellevància en processos que ocorren en humans com la migració cel·lular o la cicatrització de ferides.

2. RESUM I PARAULES CLAU

Actualment, la malaltia de Parkinson (MP), caracteritzada per la pèrdua progressiva de neurones dopaminèrgiques en la substància *nigra pars compacta*, és el segon trastorn neurodegeneratiu més prevalent al món. Els tractaments actuals aconsegueixen pal·liar els símptomes però, no aturar la malaltia. Per això, ha crescut l'interès en l'ús de models biomèdics en la cerca de compostos amb potencial terapèutic. En un mostreig a gran escala en el nostre laboratori es van seleccionar una sèrie de compostos que milloraren la capacitat locomotora. A partir d'aquest resultats, vam voler determinar l'efecte a nivell molecular de dos dels candidats, en *Drosophila melanogaster* mutant en el gen *DJ-1 β* com a model de la MP. Es van realitzar diversos assajos fenotípics utilitzant mosques tractades amb fentolamina i escopoletina, un medicament per a la hipertensió i inhibidor alfa-adrenèrgic reversible, i una cumarina amb fortes propietats antioxidants respectivament.

Per avaluar l'estrès oxidatiu es van determinar els nivells de H₂O₂, la ratio GSH/GSSG i els nivells de carbonilació de proteïnes. Per a estudiar la funció mitocondrial es van determinar els nivells d'ATP. En el cas del metabolisme de la glucosa, es van determinar els nivells de glucogen i de carbohidrats solubles. Els efectes observats envers la fentolamina es centren en el metabolisme de la glucosa mentre que l'escopoletina dona lloc a efectes en l'estrès oxidatiu, principalment per la capacitat de defensa antioxidant, la disminució parcial dels nivells de espècies reactives d'oxigen i la millora de la funció mitocondrial. Per poder confirmar quins són els mecanismes d'acció de cada molècula, caldria realitzar determinacions més específiques i l'ús d'altres models biomèdics per validar els efectes. Aquests compostos han mostrat possibles capacitats potencialment terapèutiques front la malaltia del Parkinson en aquests model mutant en *DJ-1 β* .

Paraules clau: Malaltia de Parkinson, *DJ-1*, *Drosophila melanogaster*, models biomèdics, fentolamina, escopoletina, estrès oxidatiu, funció mitocondrial, metabolisme glucosa, potencial terapèutic.

ABREVIATURES

DMSO- dimetilsulfòxid

GSH- glutatió reduït

HTS- *High-Throughput Screening*

MP- malaltia de Parkinson

MPT- modificacions post-traduccionals

ROS – *Reactive Oxygen Species*

3. INTRODUCCIÓ

3.1 LA MALALTIA DE PARKINSON

3.1.1 FISIOPATOLOGIA, MANIFESTACIONS CLÍNiques, ETIOLOGIA.

La malaltia de Parkinson (MP) és una malaltia neurodegenerativa crònica i progressiva que afecta el sistema nerviós central (SNC). Per l'envelliment de la població, tant la incidència com la prevalença han augmentat ràpidament en les passades dos dècades, posicionant la MP com un dels trastorns neurodegeneratius més comuns (Ben-Shlomo et al., 2024; Bloem et al., 2021). La MP es caracteritza per la pèrdua de neurones dopaminèrgiques en la substància *nigra pars compacta* que dona lloc a una deficiència de dopamina en el cos estriat. En alguns casos de MP, l'acumulació d' α -sinucleïna en els cossos de Lewy es una característica patològica clau. Entre els símptomes que apareixen als malalts de MP s'inclouen anomalies motores – bradicinèsia (moviments lents), rigidesa muscular, tremolors – i no motores – declivi cognitiu, depressió, estrenyiment– (Bloem et al., 2021).

La genètica, el medi ambient i la interacció entre les dues es consideren els tres factors etiològics principals de la malaltia. La MP pot ser classificada en dos tipus principals: idiopàtica (o primària) i familiar (o genètica). La forma més comuna es la MP idiopàtica que representa el 80-85% dels casos, on la causa no es pot atribuir a factors genètics o ambientals específics, encara que s'estima que la variació genètica contribueix aproximadament un 25% de risc en general (Day & Mullin, 2021). La MP familiar és causada per una mutació en un gen específic (incloent gens com *SNCA*, *PARK7* i *PRKN*) que es transmet de pares a fills, i constitueix el 15% dels casos. Aquestes mutacions ja són patològiques per se i es van identificar per anàlisis de lligaments de famílies afectades. Per altra banda, un gran nombre de variants genètiques comunes, amb una petita contribució en el risc de desenvolupar MP, es van identificar mitjançant *Genome Wide Association Studies* (GWAS) (Ye et al., 2023).

3.1.2 MECANISMES MOLECULARS DE LA MALALTIA DE PARKINSON

La patologia més característica de la malaltia de Parkinson són, com ja s'ha dit anteriorment, la pèrdua de neurones dopaminèrgiques i l'agregació de α -sinucleïna als cossos de Lewy. Tanmateix, cada vegada és més evident que diversos mecanismes moleculars interrelacionats contribueixen a la fisiopatologia de la malaltia. Aquests serien l'estrès oxidatiu, la ferroptosi, la disfunció mitocondrial, l'alteració del metabolisme de la glucosa o la neuroinflamació, entre altres.

En alguns casos de MP, l'agregació anòmala d' α -sinucleïna, una proteïna implicada en la regulació de les vesícules sinàptiques i la funció mitocondrial, és un dels mecanismes més destacats. Aquesta proteïna pot formar oligòmers i fibril·les tòxiques, quan els sistemes de degradació cel·lular, com el proteasoma o l'autofàgia fallen. Aquestes formes agregades interfereixen amb la funció neuronal i contribueixen a la mort cel·lular (Dong-Chen et al., 2023).

L'estrès oxidatiu juga un paper central en la patogènesi de la MP. El desequilibri entre la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i la capacitat antioxidant de la cèl·lula genera danys a lípids, proteïnes i ADN, afavorint tant l'agregació d' α -sinucleïna com la disfunció mitocondrial. A més, l'estrès oxidatiu promou l'oxidació de dopamina a quinones reactives, que potencien la toxicitat neuronal i interfereixen amb els processos d'autofàgia (Dionísio et al., 2021).

Altre mecanisme que contribueix a la progressió de la MP és la disfunció mitocondrial. Les neurones dopaminèrgiques depenen del metabolisme oxidatiu per generar ATP. Les alteracions en el complex I de la cadena de transport electrònic, que pot donar-se per l'acumulació d' α -sinucleïna a la mitocòndria, condueixen a una menor producció d'energia i a un augment dels nivells de ROS. A més, mutacions en gens com *PINK1*, *PRKN*, *DJ-1* o *LRRK2* alteren la mitofàgia, la biogènesi mitocondrial i la regulació del cicle oxidatiu, contribuint a la vulnerabilitat de les neurones (Alqahtani et al., 2023).

D'altra banda, s'han observat alteracions en el metabolisme de la glucosa, amb hipometabolisme cerebral i intolerància a la glucosa en molts pacients. Aquesta disfunció, que pot anar acompanyada de hiperglucèmia, augmenta els nivells de ROS, redueix la producció d'ATP, augmenta la susceptibilitat de les neurones dopaminèrgiques i provoca dèficit energètic. A més, l' α -sinucleïna pot interferir amb enzims clau de la glicòlisi, com *GADPH*, estimulants aquesta via com a mecanisme compensatori per a la generació d'energia (Dai et al., 2023).

Finalment, la neuroinflamació crònica és un component essencial en l'evolució de la MP. Les microglies activades alliberen citocines inflamatòries i ROS, afavorint l'estrès oxidatiu i la ferroptosi. Aquest estat inflamatori pot amplificar els efectes tòxics de les proteïnes malplegades i dels metabòlits oxidats, tancant un cercle viciós que afavoreix la degeneració progressiva (Alqahtani et al., 2023).

En conjunt, la MP és una patologia multifactorial, on mecanismes interaccionen de manera complexa per causar degeneració molecular. La comprensió d'aquests processos és essencial pel desenvolupament de teràpies efectives i dirigides.

3.1.3 LA PROTEÏNA DJ-1

La proteïna DJ-1, codificada pel gen *DJ-1/PARK7* (cromosoma *1p36*), està conservada evolutivament i conté 189 aminoàcids. Actua en forma de homo-dímer funcional, i la seua activitat està regulada per diverses modificacions post-traduccionals (MPT), com l'oxidació, la sumoilació i la S-nitrosilació, que modulen la seua funció i estabilitat estructural (Xiao et al., 2021).

Un dels residus més rellevant és la cisteïna 106 (Cys 106), que actua com un sensor redox altament sensible. Aquesta pot oxidar-se a àcid sulfènic (-SOH) o sulfinic (-SO₂H), formes que mantenen l'activitat protectora de DJ-1, mentre que l'oxidació a àcid sulfònic (-SO₃H) genera una forma inactiva. A més, la sumoilació de la lisina 130 (K130) és essencial per a l'activitat biològica de DJ-1, i s'indueix en condicions d'estrès oxidatiu. Les cisteïnes C46 i C53, també són sensibles i poden patir oxidació o S-nitrosilació, modificacions que comprometen l'estabilitat del dímer i la capacitat funcional de la proteïna (Lind-Holm Mogensen et al., 2023).

En condicions fisiològiques, DJ-1 exerceix múltiples funcions cel·lulars essencials, principalment com a sensor i neutralitzador de l'estrès oxidatiu actuant com antioxidant directe disminuint els nivells de peròxid d'hidrogen (H₂O₂). També activa rutes cel·lulars de defensa com la via *Nrf2*, participa en la correcta funció mitocondrial i evita l'agregació de proteïnes malplegades. Així mateix, pot modular altres antioxidants i rutes de supervivència com *Akt* i *PTEN*, contribuint a la resistència neuronal davant agressions oxidatives (Panicker et al., 2021).

Mutacions de pèrdua de funció en el gen *DJ-1*, provoquen una forma autosòmica recessiva de la MP. Aquestes mutacions poden ser delecions de múltiples exons o mutacions puntuals com L166P (que impedeix la formació del dímer). Tot i que només representen aproximadament l'1% dels casos d'inici precoç de la malaltia, i que només un 5-10% dels casos totals de MP són de tipus familiar, s'ha observat nivells elevats de proteïna DJ-1 oxidada en cervells d'individus amb MP idiopàtic (Xiao et al., 2021). Aquest fet suggereix que *DJ-1* podria tenir un paper rellevant en formes no genètiques de la malaltia.

En conseqüència, ha augmentat l'interès en el desenvolupament de models preclínic deficients en el gen *DJ-1*, especialment per estudiar els mecanismes de neurodegeneració i avaluar estratègies terapèutiques.

3.2 MODELS PRECLÍNICS PER A L'ESTUDI DE LA MP I ÚS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* EN LA IDENTIFICACIÓ DE COMPOSTOS AMB POTENCIAL TERAPÈUTIC FRONT EL PARKINSON

Actualment, el tractament de la MP s'enfoca en pal·liar o alentir els símptomes però, no hi ha una cura definitiva. La farmacoteràpia amb dopamina és la principal estratègia, destacant la L-DOPA, precursor d'aquest neurotransmissor que pot creuar la barrera hematoencefàlica (Dong-Chen et al., 2023). Tot i ser el tractament més efectiu pels símptomes motors, al mateix temps, pot provocar fluctuacions motores i discinèsies en el temps. Altres opcions inclouen els agonistes dopaminèrgics, com la promipexola o la ropinirola, que estimulen els receptors dopaminèrgics.

Per tant, s'han de trobar nous fàrmacs i formulacions per millorar l'eficàcia i reduir els efectes adversos dels tractaments existents. A més, els símptomes no motors requereixen estratègies addicionals i personalitzades. Per això, amb l'objectiu d'estudiar la MP i noves formes de tractar-lo, ha crescut l'interès en l'ús de models preclínic en la investigació.

Els models tradicionals es basen en l'exposició a tòxics que indueixen la destrucció ràpida de neurones dopaminèrgiques. Substàncies com 6-OHDA (6-hidroxidopamina) o MPTP (1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina) i el seu derivat MPP⁺, causen alteracions motores molt marcades (Dong-Chen et al., 2023). Com a models animals mamífers, s'acostuma a utilitzar rosegadors i primats no humans, mentre que en el cas de invertebrats, destaquen *Caenorhabditis elegans* i *Drosophila melanogaster*. Els models cel·lulars permeten estudiar malalties humanes en entorns controlats. A més, cal tenir en compte, que en les malalties neurodegeneratives, no només intervenen neurones sinó també altres tipus cel·lulars. Per això, els models *in vitro* han d'incloure aquesta diversitat com ho han aconseguit els cultius en 2D o com els 3D que reproduïxen millor la complexitat del cervell i les interaccions cel·lulars (Solana-Manrique et al., 2025).

Per utilitzar *Drosophila* en el descobriment de tractaments per a la MP s'han de tenir en compte una sèrie d'aspectes importants (Sanz et al., 2017). Cal tenir un bon model biomèdic que reproduïxi els efectes clau de la malaltia humana i símptomes similars als dels pacients humans. L'administració de compostos ha de ser de manera eficient tenint

en compte l'etapa de desenvolupament (larva, pupa, adult) en què apareix el fenotip a estudiar. A més, es poden provar compostos a partir de cribratges dirigits o HTS (*High-Throughput Screening*) massius. En els dirigits, es proven pocs compostos i s'enfoca en mecanismes concrets mentre que en la HTS, es proven centenars o milers de fàrmacs, fent una exploració àmplia i sense biaix. A més, en aquest cribratges s'utilitzen fenotips en les mosques on es poden detectar fàcilment canvis visibles i quantificables, fet que ajuda a identificar fàrmacs prometedors (Sanz et al., 2021).

Una vegada s'ha tractat *Drosophila melanogaster* amb el compost candidat cal estudiar els efectes d'aquest sobre l'organisme model per així, determinar si tenen potencial terapèutic i poder identificar canvis fisiològics, en el comportament, neuronals i bioquímics provocats pel tractament (Solana-Manrique et al., 2019).

3.2.1 RASTREIG A GRAN ESCALA DE COMPOSTOS AMB POTENCIAL TERAPÈUTIC FRONT LA MP

Estudis anteriors en el nostre laboratori han investigat la malaltia de Parkinson gràcies a la utilització de *Drosophila melanogaster* com a model d'experimentació basat en la deficiència del gen *DJ-1 β* (ortòleg del gen *DJ-1* humà) (Park et al., 2005). Aquest model mostra una reducció significativa de la capacitat motora en els assaigs d'escalada. A nivell molecular, es caracteritza per un desequilibri de l'estat redox, la disfunció mitocondrial (Casani et al., 2013) i l'alteració del metabolisme de la glucosa (Solana-Manrique et al., 2022). Degut a la manca de proteïna DJ-1 β , aquestes mosques perden la capacitat de resposta front els radicals lliures i molècules pro-oxidants. La pèrdua de defensa antioxidant provoca un augment dels nivells de H₂O₂ que contribueix parcialment al *pool* total de ROS. Aquestes espècies reactives augmentarien la carbonilació de proteïnes, una MPT deguda a la seua reacció amb els aminoàcids. A més, els elevats nivells de ROS i sense defensa antioxidant, els nivells de glutatió reduït disminueixen i no es regeneren, fent que la ratio GSH/GSSG disminueixi. Aquest model també presenta menors nivells d'ATP, indicant disfunció mitocondrial i menor rendiment per obtenir energia requerida per les neurones. En quant al metabolisme de la glucosa, el model presenta nivells de glicogen i de carbohidrats solubles més elevats respecte el control (Sanz, Solana-Manrique, Lilao-Garzón, et al., 2022).

Amb aquest model biomèdic, mosques mutants *DJ-1 β* , es va dur a terme un HTS. Es van utilitzar compostos de la PCL (*Prestwick® Chemical Library*) que s'administraren durant el desenvolupament larvari com en els primers dies de les mosques adultes, i es van fer

assajos d'escalada per determinar quins milloraven la funció locomotora. A més, alguns es van validar en cèl·lules humanes *SH-SY5Y* deficientes en *DJ-1* (Sanz et al., 2021). Entre els compostos identificats trobem la fentolamina i l'escopoletina, que van provocar una millora locomotora en els mosques model. El mecanisme d'acció dels dos compostos es d'interès farmacològic; la fentolamina com a antagonista adrenèrgic amb possibles efectes sobre la neurotransmissió i l'escopoletina per les propietats antioxidants i neuroprotectores.

4. HIPÒTESI DEL TREBALL I OBJECTIUS

Atenent els coneixement anteriors relacionats amb la MP, l'ús del model en *Drosophila melanogaster* deficient en el gen *DJ-1 β* en l'estudi de la malaltia i la necessitat de trobar nous fàrmacs, s'hipotetitza que els dos compostos candidats, identificats al HTS previs, milloren la capacitat locomotora dels mutants, exercint efectes a nivell molecular millorant l'estrès oxidatiu, la funció mitocondrial o el metabolisme de la glucosa.

Per poder comprovar la hipòtesi es plantegen els següents objectius:

1. Analitzar la capacitat d'aquests dos compostos de modificar trets fenotípics associats a la MP utilitzant mutants en *DJ-1 β* .
2. Proposar el possible mecanisme pel qual aquests fàrmacs podrien estar exercint els canvis fenotípics mostrats.

5. MATERIALS I MÈTODES

5.1 SOCA DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Per a dur a terme aquest treball de fi de grau, s'ha utilitzat la soca model $w^{1118}; DJ-1\beta^{ex54}$ (a partir d'ara *DJ-1 β*) cedida pel laboratori del Dr. J. Chung (Park et al., 2005). Aquesta línia presenta una deleció de 450pb i s'han eliminat els dos primers exons del gen *DJ-1 β* i el lloc d'inici de la traducció del mateix gen. Per tant, es considera una pèrdua total de la proteïna.

La soca es manté a 25 °C en medi de cultiu estàndard (% p/v): sucre 5%; llevat 6%; farina de blat de moro 6%; farina de soia 1%; agar 1,05%; nipagin (parahidocibenzoat de metilo) 0,3%; etanol 1%; àcid propiònic 0,5%; H₂O. Les botelles amb medi fresc es canvien tres vegades per setmana. D'aquesta manera es promou l'amplificació de les mosques per a tenir-ne prou nombre de mosques pels experiments.

5.2 COMPOSTOS D'ESTUDI

Els dos compostos candidats del HST són la fentolamina i l'escopoletina. Per tractar les mosques es va utilitzar *Phentolamine mesylate* (TargetMol®, ODR-3970) a una concentració de 40 μ M i *Scopoletin*, 95 % (Thermo Scientific Chemicals, 302900010) a una concentració de 10 μ M. Ambdós compostos es van dissoldre en dimetilsulfòxid (DMSO) (100%) com a vehicle i la concentració final de DMSO en el tractament va ser del 0,1 %.

5.3 TRACTAMENT DE LES SOQUES DE *DROSOPHILA MELANOGASTER* AMB ELS COMPOSTOS D'ESTUDI

Per poder obtenir prou nombre de mosques en diferents condicions i per als posteriors experiments, es va preparar el sistema de posada **Figura 1**.

Es van preparar 10 sistemes que consistien en un vas i una placa de cultiu petri (1). D'aquesta manera es deixaven les mosques 24 h per a que ficaren ous a la primera placa i s'habituarren al sistema (2). Al segon dia, es canviava la placa petri per una nova (3). Amb aquestes plaques es van recollir entre 80-100 larves en estadi L1 i es van transferir a tubs amb menjar amb i sense tractament (4). Es van preparar 5 tubs amb DMSO 0,1% com a control i pels tractaments 5 tubs amb Fentolamina (40 μ M) i 5 per a Escopoletina (10 μ M). Les composicions i concentracions del medi es detallen a **Taula 1**. Aquests tubs es van mantenir a 25 °C durant uns 10 dies fins obtenir les mosques femelles que es traspasaren a nous tubs amb menjar amb i sense tractament (5). Es deixaren 5 dies més

en aquests tubs abans de realitzar l'assaig d'escalada (6). Finalment, es van congelar a -80 °C per conservar-los abans de fer els posteriors assaigs (7).

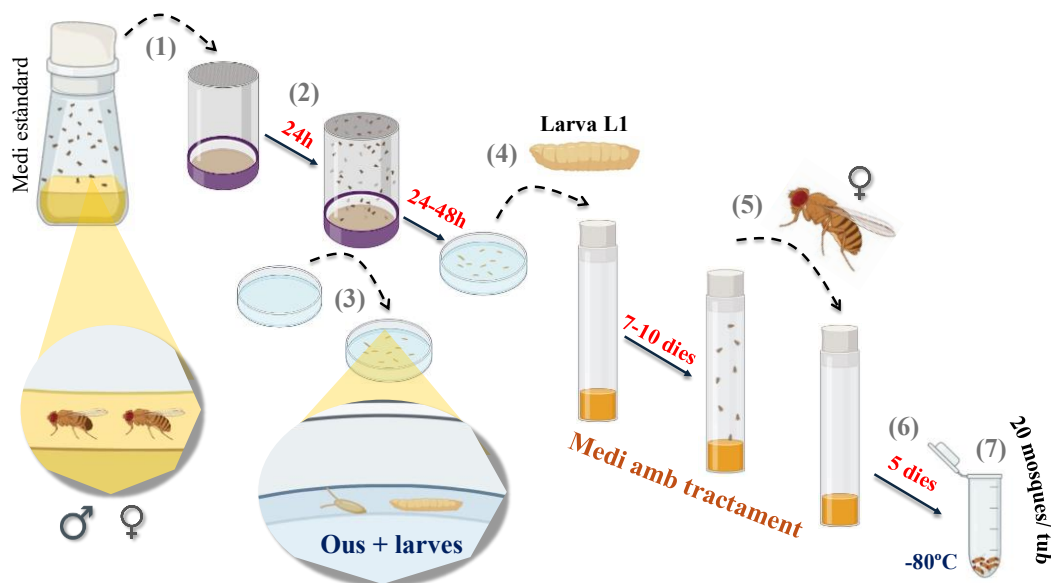


Figura 1. Sistema de posada d'ous i tractament de la soca de *Drosophila melanogaster* amb els compostos d'estudi.

Taula 1. Composició del menjar suplementada amb DMSO, FENTO o ESCOPO. Per a cada condició es van preparar 50ml. En cada tub es van dispensar 5ml.

Component	Concentració final	Quantitat (V _T =50mL)	
Medi de cultiu	¾	37,5 mL	
Control/Tractament	¼	12,5mL	
DMSO (0,1%)	-	50 µL	12,45 mL
FENTO (40 µM)	8,064 µL	50 µL	12,44 mL
ESCOPO (10 µM)	1,92 µL	48 µL	12,45 mL
Compost	DMSO (0,1%)	dH2O	

5.4 QUANTIFICACIÓ DELS NIVELLS DE H₂O₂

Els nivells de peròxid d'hidrogen (H₂O₂) es van determinar amb el kit comercial *Amplex™ Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit* (Invitrogen, A22188). Les mostres es van obtenir de la homogeneïtzació de 10 mosques femelles de cinc dies en 200µ de Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) utilitzant el *Tissuelyser LT* (Qiagen) a 50 Hz, 5 min. Després es van centrifugar a 14.500g durant 10 min a 4 °C. Es va recuperar el sobrenedant i es va utilitzar el mateix dia.

Aquest assaig es basa en la quantificació dels nivells de H_2O_2 utilitzant el *Amplex Red reagent* (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) en combinació de la HRP (*Horseradish Peroxidase*). Abans de tot es van diluir les mostres (1/2). En una placa negra de 96 pouets (*Greiner 96 well Black plate, polypropylene*) es van afegir 50 μ L de mostra amb 50 μ L de Solució de treball 100 μ M reactiu *Amplex Red* i 0,2 U/mL HRP. Una vegada s'ha iniciat la reacció, es va incubar la placa durant 30 min en obscuritat. Amb l'ús del *Infinite 200 PRO Reader* (Tecan) es va mesurar la fluorescència a una excitació de 571 nm i a una emissió de 585 nm.

5.5 QUANTIFICACIÓ DELS NIVELLS DE CARBONILACIÓ DE PROTEÏNES

Per poder quantificar els nivells de carbonilació de proteïnes es va dur a terme la derivatització de les mostres amb 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) com es va descriure en (Solana-Manrique et al., 2020). Aquestes mostres consistien en un extracte de mosques de 5 dies, que es van obtenir a partir de l'homogeneïtzació de 10 mosques femelles en 200 μ L de tampó Tris-HCl (50mM pH 7.4). Es va utilitzar el *TissueLyser LT* (Qiagen) durant 5 min a 50Hz. Els extractes es van centrifugar a 9000g durant 8 min a 4° C en una centrífuga 5417R (Eppendorf). El sobrenedant resultant, es van congelar a -80 °C fins el seu us.

L'assaig de derivatització amb DNPH es va realitzar en una placa de 96 pouets transparent. En cada pou es van afegir 50 μ L de solució DNPH (10mM DNPH i 0,5M H_2SO_4) i 50 μ L d'extracte de mosca. Després de 10 min a temperatura ambient, la reacció es va aturar amb 25 μ L de NaOH (6M). L'absorbància a 450 nm es va llegir als 10 min en el lector de plaques *Infinite Pro 200* (Tecan).

Els resultats obtinguts es van normalitzar amb la quantitat de proteïna present en cada mostra (nivells de carbonilació/mg proteïna). Per això, es va realitzar un assaig BCA (*Bicinchoninic Acid*) a partir del kit comercial *PierceTM BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, 23227). En una placa de 96 pouets transparent es van afegir 12,5 μ L de mostra o de patró i 100 μ L de *Reaction Buffer* (50A:1B, sent A i B components del Kit). Es va incubar durant 30 min a 37 °C i es va deixar refredar a temperatura ambient. Es va fer la lectura de l'absorbància a 562nm en el lector de plaques *Infinite Pro 200* (Tecan). Per a cada control i els tractaments es van mesurar els nivells de tres rèpliques biològiques amb tres rèpliques tècniques cada una.

5.6 QUANTIFICACIÓ DELS NIVELLS DE GSH/GSSG

Els nivells de glutatió reduït (GSH) es van determinar amb el kit comercial *GSH/GSSG Ratio Detection Assay Kit (Fluorometric - Green)* (Abcam, 138881). Les mostres es van obtenir de la homogeneïtzació de 20 mosques femelles de cinc dies com s'ha explicat anteriorment en el 5.1. Abans de realitzar l'assaig s'han de fer dos passos previs, un de desproteïnitització i un altre de neutralització amb el *Deproteinizing Sample Preparation Kit – TCA* (Abcam, AB204708). Primer, s'afegeixen 15 µL de TCA (*Trichloroacetic Acid Solution*) al 100% (p/v) per 100 µL de mostra i es deixa en gel 15 min abans de centrifugar a 12000g durant 5 min. S'afegeix 20µL de *Cold Neutralization Buffer* al sobrenedant. Es deixa ventilar el CO₂ en gel durant 5 min i es guarda a -80 °C.

Per a l'assaig cal preparar dos solucions, la mescla d'assaig de GSH (*GAM*) per detectar el GSH i la mescla d'assaig de glutatió total (*TGAM*) per detectar el GSH i el GSSG. Per al *GAM* es va fer una dilució 1:50 de *Thiol Green Stock amb Assay Buffer Solution* (50X). Per al *TGAM* es va fer una dilució 1/25 de la *GSSG Probe Stock* amb *GAM Solution* (25X).

L'assaig es va dur a terme en una placa negra de 96 pouets on es van afegir 50 µL de mostra a 50µL de *GAM* o de *TGAM*. Es va incubar entre 10-60 min protegit de la llum abans de monitoritzar la fluorescència (Ex/Em= 490/520 nm) en un lector de fluorescència de plaques.

5.7 DETERMINACIÓ DELS NIVELLS D'ATP

Per a determinar els nivells d'ATP es va utilitzar el kit comercial *ATP Determination kit* (Invitrogen, A22066). El principi de l'assaig és mesurar la luminescència produïda per l'enzim luciferasa en el tampó de reacció a partir d'un dels seus substrats, en aquest cas, l'ATP.

Els nivells d'ATP es van determinar en una placa de 96 pouets blanca (*Greiner 96 Flat White*). Primer, es van homogeneïtzar grups de 5 mosques en 200 µL de *Reaction Buffer 1X* preparat a partir de la solució 20X del kit en el *TissueLyser LT* (*Qiagen*) durant 5 min a 50Hz. Es van bullir els extractes 4 min a 95 °C per desnaturalitzar les proteïnes. Seguidament, es van centrifugar a 18500g a 4 °C durant 10 min i es van guardar a -80°C. En la placa es van afegir 100 µL de *Standard Reaction Solution* preparada seguint les indicacions del kit (*TAULA 2*) a 5 µL de la mostra. Es va llegir la luminescència en el lector de plaques *Infinite Pro 200* (*Tecan*).

Taula 2. Preparació de la Standard Reaction Solution. Quantitats de cada reactiu per a la preparació d'1mL de solució.

dH ₂ O	Reaction Buffer 20X	0,1M DTT	10mM D-luciferin	Firefly Luciferase 5mg/mL stock
890 µL	50 µL	10 µL	50 µL	0,25 µL

5.8 DETERMINACIÓ DELS NIVELLS DE GLUCOGEN I CARBOHIDRATS SOLUBLES

La quantificació de glucogen com dels carbohidrats solubles es va realitzar seguint el protocol adaptat de (Sanz, Solana-Manrique, Lilao-Garzón, et al., 2022). Aquest consisteix en utilitzar l'antrona, un compost que reacciona amb mono, di i polisacàrids en suspensió i dona lloc a una coloració verda o blava. Les mostres es van obtenir homogeneïtzant grups de 5 mosques amb 200 µL de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 1X utilitzant el *TissueLyser LT* (*Qiagen*) durant 2 min a 50 Hz. Els extractes es van centrifugar a 180 g, 10 min a 4 °C. A 90 µL de sobrenedant se li van afegir 10 µL de Na₂SO₄ al 20% (p/v) i 750 µL d'etanol al 100% (v/v). Es van agitar fortament i es centrifugaren a 180g, 15 min a 4 °C. El precipitat obtingut contenia el glucogen mentre que el sobrenedant els carbohidrats solubles.

Per a quantificar el glucogen, es va rentar el pellet dos vegades amb metanol al 20% i després se li va afegir el reactiu antrona [1,42 mg/mL en H₂SO₄ al 70% (v/v)]. S'incubaren les mostres a 90°C durant 15 min i es refredaren en gel. Per últim, es va mesurar l'absorbància a 625 nm d'una placa de 96 pouets transparent que contenia 200 µL de mostra, utilitzant el lector de plaques Infinite 200 PRO (Tecan).

Per a quantificar els nivells de carbohidrats solubles, el sobrenedant es va centrifugar en la centrifuga de buit fins que en va quedar aproximadament uns 20 µL de mostra. Es van afegir 750 µL de antrona [1,42 mg/mL en H₂SO₄ al 70% (v/v)]. S'incubaren les mostres a 90 °C durant 15 min i es refredaren en gel. Per últim, es va mesurar l'absorbància a 625 nm d'una placa de 96 pouets transparent que contenia 200 µL de mostra, utilitzant el lector de plaques Infinite 200 PRO (Tecan).

Tant en la quantificació de glucogen com la carbohidrats solubles es realitzaren tres rèpliques biològiques i tres rèpliques tècniques i els resultats es referenciaren al valor del grup control.

5.9 ANÀLISI ESTADÍSTIC

En tots els assaigs fenotípics es van realitzar tres rèpliques biològiques i tres rèpliques tècniques de cada grup experimental i els valors es referenciaren als valor del grup control (DMSO). Es va utilitzar el programa *IB, SPSS Statistics* 29.0 per a fer l'anàlisi de les dades obtingudes. Per a analitzar l'efecte dels diferents tractaments en la soca de *Drosophila* es va determinar aplicant el test ANOVA basat en l'anàlisi de variància dels grups d'estudi. Després es van realitzar comparacions múltiples de la mitjana de cada grup aplicant el test de Tukey. Les dades de la mitjana s'expressen com mitjana desviació estàndard i per a la significança, s'expressen com p-valors: (*)p-valor $\leq 0,05$; (**)p-valor $\leq 0,01$ i (***) p-valor $\leq 0,001$.

Els gràfics es van representar utilitzant el Graphpad Prism versió 9.0.2 (161) i els valors es mostren en mitjana $\pm$ desviació estàndard.

6. RESULTATS

En la cerca de nous fàrmacs amb potencial terapèutic front la malaltia de Parkinson, l'ús de models biomèdics com *Drosophila melanogaster*, ens dona informació sobre l'efecte dels compostos en un organisme complex (Solana-Manrique et al., 2019). Estudis previs al laboratori van avaluar el rendiment motor de les mosques mitjançant un assaig d'escalada. La línia control y^1, w^{1118} (en endavant y,w) va ser comparada amb la soca mutant *DJ-1 β* . Aquesta soca mutant presentava una menor capacitat d'escalada respecte la línia control, indicant defectes motors de la mateixa manera que els pacients de la MP (*Annex Figura 1*).

En el HTS (cribratge d'alt rendiment) es va avaluar tant la viabilitat en cèl·lules com la capacitat d'escalada de les mosques mutants *DJ-1 β* tractades amb diferents compostos (Sanz et al., 2021) (*Annex Figura 2*). Entre els diferents compostos testats, la fentolamina va mostrar una capacitat relativa d'escalada d'1,55 (p-valor= $1,5 \cdot 10^{-5}$), mentre que per a l'escopoletina va ser d'1,7 (p-valor= $5,8 \cdot 10^{-7}$). Si la capacitat relativa d'escalada del control és 1, aquests dos compostos millorarien significativament aquests tret fenotípic.

Vista aquesta millora de la capacitat locomotora, vam avaluar l'efecte dels compostos candidats d'estudi mitjançant diferents assajos fenotípics en el nostre model de MP. Els resultats de l'efecte a nivell molecular, es mostren en els següents apartats.

6.1 AVALUACIÓ DE L'EFFECTE TERAPÈUTIC DELS COMPOSTOS D'ESTUDI EN L'ESTRÈS OXIDATIU EN EL MODEL DE MP DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

La proteïna DJ-1 té un rol fonamental en la defensa front l'estrès oxidatiu mitjançant diferents vies (Lind-Holm Mogensen et al., 2023). En la mateixa línia els models de MP basats en la deficiència del gen *DJ-1* presenten nivells elevats de ROS (Casani et al., 2013). Les mosques mutants van exhibir nivells elevats de ROS total, de H_2O_2 (*Annex Figura 3*) i de carbonilació de proteïnes (*Annex Figura 4*) com ocorre en la patologia de la MP.

Per tant, vam avaluar si l'efecte dels compostos suprimien aquests fenotips en els mutants *DJ-1 β* (*Figura 2*). Els nostres resultats van mostrar que les mosques de 5 dies després d'eclosionar, que van ser tractades amb fentolamina, no mostraren canvis significatius en els nivells de H_2O_2 (un component del pool total de ROS). En canvi, l'escopoletina va mostrar una lleugera disminució dels nivells d' H_2O_2 en comparació amb les mosques tractades amb el vehicle (DMSO).

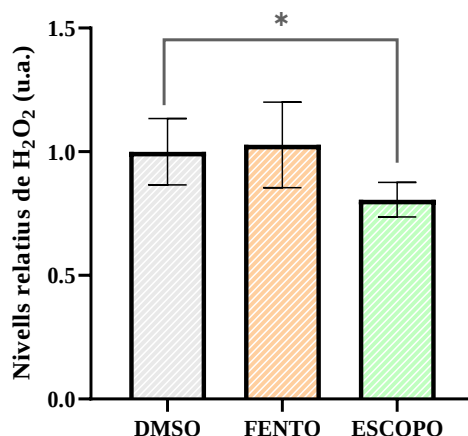


Figura 2. Nivells relatius de H₂O₂ de mosques *DJ-1β* de 5 dies d'edat tractades amb els diferents compostos candidats: fentolamina (FENTO 40 μM), escopoletina (ESCOPO 10 μM) i DMSO (0,1 %). Els valors es troben referenciats respecte els nivells de H₂O₂ de les mosques tractades amb DMSO.

Seguidament, es va avaluar l'efecte dels compostos sobre la carbonilació de proteïnes, una MPT induïda pels nivells de ROS. Els resultats no van mostrar cap canvi significatiu dels nivells de carbonilació en les mosques mutants *DJ-1β* tractades amb fentolamina ni amb escopoletina (Figura 3).

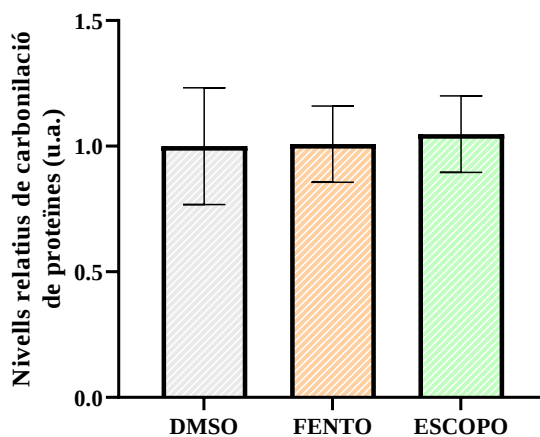


Figura 3. Nivells relatius de carbonilació de proteïnes de mosques *DJ-1β* de 5 dies d'edat tractades amb els diferents compostos candidats: fentolamina (FENTO 40 μM), escopoletina (ESCOPO 10 μM) i DMSO (0,1 %). Els valors es troben referenciats respecte els nivells de carbonilació de proteïnes de les mosques tractades amb DMSO.

Per acabar amb l'avaluació de l'estat redox, vam determinar els nivells de la ratio GSH/GSSG. L'estrès oxidatiu es deu tant per la sobreproducció de ROS com per una disminució de la capacitat antioxidant. S'ha observat que en models de MP deficientes en *DJ-1* es veuen disminuïts els nivells de glutatió reduït, indicant una reducció en la resposta antioxidant (Messaoudi et al., 2013).

Els nostres resultats mostren l'efecte dels compostos en la ratio GSH/GSSG (*Figura 4*). En el cas de la fentolamina va mostrar una tendència a augmentar-la. Per altra banda, l'escopoletina va augmentar significativament aquest paràmetre de capacitat antioxidant.

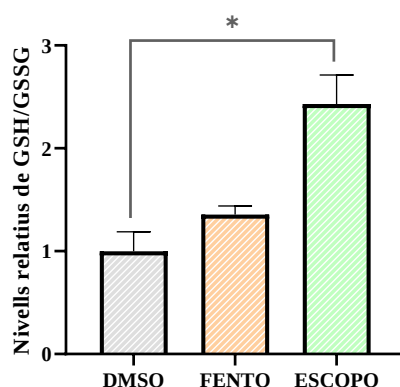


Figura 4. Nivells relatius de la ratio GSH/GSSG en mosques *DJ-1β* de 5 dies d'edat tractades amb els diferents compostos candidats: fentolamina (FENTO 40 μ M), escopoletina (ESCOPO 10 μ M) i DMSO (0,1%). Els valors es troben referenciats respecte els nivells de la ratio GSH/GSSG de les mosques tractades amb DMSO.

6.2 AVALUACIÓ DE L'EFECTE TERAPÈUTIC DELS COMPOSTOS D'ESTUDI EN LA FUNCIÓ MITOCONDRIAL EN EL MODEL DE MP DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

La disfunció mitocondrial s'ha relacionat amb la patogènesi de la MP (Alqahtani et al., 2023). Estudis previs van demostrar que les deficiències en *DJ-1* alteren la morfologia i el metabolisme energètic. Concretament, el nostre model mutant presenta nivells d'ATP menors respecte el control y,w (Solana-Manrique et al., 2022) (*Annex Figura 5*).

Per avaluar l'efecte dels compostos d'estudi en les mosques mutants sobre la funció mitocondrial, es van determinar els nivells d'ATP com a indicador del metabolisme energètic. Els resultats van mostrar que la fentolamina no va induir canvis significatius, mentre que l'escopoletina va augmentar significativament aquest paràmetre (*Figura 5*).

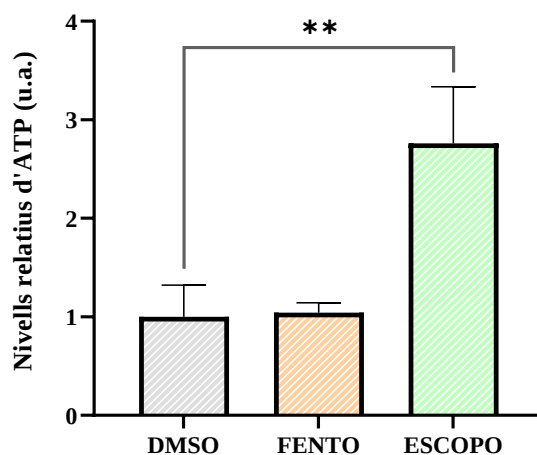


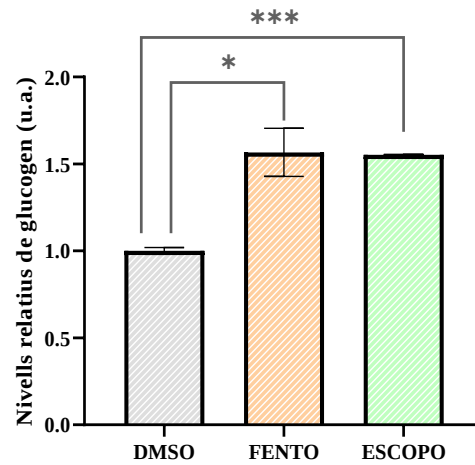
Figura 5. Nivells relatius d'ATP en mosques *DJ-1β* de 5 dies d'edat tractades amb els diferents compostos candidats: fentolamina (*FENTO* 40 μ M), escopoletina (*ESCOPO* 10 μ M) i *DMSO* (0,1%). Els valors es troben referenciats respecte els nivells d'ATP de les mosques tractades amb *DMSO*.

6.3 AVALUACIÓ DE L'EFFECTE TERAPÈUTIC DELS COMPOSTOS D'ESTUDI EN EL METABOLISME DE LA GLUCOSA EN EL MODEL DE MP DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

La MP cursa amb alteracions metabòliques produint canvis com l'alteració del metabolisme de la glucosa. El mutant *DJ-1β* va presentar nivells elevats de glucogen i de carbohidrats lliures respecte el control *y,w* (Sanz, Solana-Manrique, Lilao-Garzón, et al., 2022) (*Annex Figura 6*). Aquest fet indica un augment de vies glicolítiques, probablement per contrarestar la reducció dels nivells d'ATP per la disfunció mitocondrial (Solana-Manrique et al., 2020).

Per observar els efectes del compostos sobre aquest metabolisme, vam determinar els nivells de glucogen i carbohidrats solubles. Els nostres resultats mostren un augment dels nivells d'aquest polisacàrid tant en les mosques tractades amb fentolamina i escopoletina respecte el control *DMSO* (*Figura 6A*). En el cas dels carbohidrats solubles, no es van observar canvis en els nivells de les mosques tractades respecte el control (*Figura 6B*).

A



B

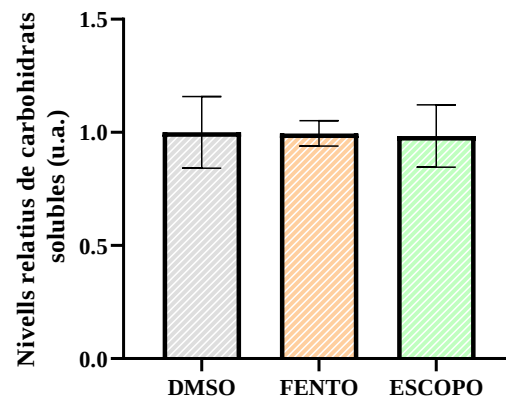


Figura 6. (A) Nivells relatius de glucogen en mosques *DJ-1 β* de 5 dies d'edat tractades amb els diferents compostos candidats: fentolamina (FENTO 40 μ M), escopoletina (ESCOPO 10 μ M) i DMSO (0,1%). **(B)** Nivells relatius de carbohidrats solubles en mosques *DJ-1 β* de 5 dies d'edat tractades amb els diferents compostos candidats: fentolamina (FENTO 40 μ M), escopoletina (ESCOPO 10 μ M) i DMSO (0,1%). Els valors es troben referenciats respecte els nivells de glucogen (A) i de carbohidrats solubles (B) de les mosques tractades amb DMSO.

7. DISCUSSIÓ

Davant l'augment dels casos de MP, segona malaltia neurodegenerativa més prevalent, sorgeix la necessitat de desenvolupar estratègies terapèutiques. Per això, al nostre laboratori es va dur a terme un assaig HTS *in vivo* amb el model de MP de *Drosophila melanogaster* (Sanz et al., 2021). Es va avaluar l'efecte sobre la capacitat motora d'un gran nombre de compostos i es van identificar els que presentaven una millora en aquest paràmetre. El pas següent va ser realitzar diferents assajos per mostrar els efectes dels compostos en organismes model, com va ser el cas del Zaprinas (Sanz et al., 2021) o la Vincamina (Sanz, Solana-Manrique, & Paricio, 2022). Continuant en la mateixa línia de cribratge de compostos, en aquest Treball Final de Grau ens hem centrat en altres dos candidats que van mostrar un augment de la capacitat relativa d'escalada i que podrien presentar efectes potencialment terapèutics a nivell molecular front la MP.

La fentolamina és un inhibidor α 2-adrenèrgic utilitzat per tractar la pressió arterial molt elevada, el diagnòstic d'un tipus de tumor de la glàndula suprarenal, el feocromocitoma, i revertir les reaccions locals d'adormiment de l'anestèsia (Sardana et al., 2023). Tot i que encara no s'ha estudiat l'efecte de la fentolamina en la MP, sí que s'ha avaluat la seua influència en diversos neurotransmissors (Sardana et al., 2023).

La MP presenta alts nivells d'estrès oxidatiu a causa de la sobreproducció de ROS i una disminució de la defensa antioxidant (Dionísio et al., 2021). Per això, vam mesurar els nivells de H_2O_2 i els de carbonilació de proteïnes per avaluar els nivells de ROS, mentre que la proporció GSH/GSSG ens reflexa l'estat d'un dels mecanismes de defensa antioxidant. Els nostres resultats ens indiquen que la fentolamina no té efectes en aquests paràmetres escollits per avaluar l'estrès oxidatiu, tot i que es pot observar una certa tendència a augmentar els nivells de la ratio GSH/GSSG.

Per determinar l'efecte dels compostos sobre la disfunció mitocondrial present en la MP (Alqahtani et al., 2023), es van mesurar els nivells d'ATP. La fentolamina no va mostrar canvis en els nivells respecte el control, indicant que no té efectes visibles sobre el metabolisme energètic mitocondrial en no augmentar els nivells d'ATP.

Altra de les causes patològiques de la MP és l'alteració del metabolisme de la glucosa (Dai et al., 2023). Per estudiar els efectes dels compostos sobre aquest metabolisme, es van determinar els nivells de glucogen i de carbohidrats lliures. La fentolamina va

augmentar significativament els nivells de glucogen respecte al control però, no els de carbohidrats solubles.

A partir dels nostres resultats podem dir que per a la fentolamina no s'han observat canvis en els paràmetres relacionats amb l'estrès oxidatiu ni en la disfunció mitocondrial en el model de MP de *Drosophila melanogaster*. En canvi, si que s'han observat canvis relacionats amb el metabolisme de la glucosa. En el següent estudi es va proposar que l'augment dels nivells de glicogen es pot donar com a mecanisme compensatori a la disminució dels nivells d'ATP (Solana-Manrique et al., 2020), però en aquest cas, el nostre model no ha presentat un augment dels nivells d'aquesta molècula energètica. Amb les dades que disposem no es pot donar una explicació a aquest augment dels nivells de glicogen. De fet, ens podria indicar que el metabolisme no és capaç d'utilitzar-lo. Per tant, sembla ser que la millora locomotora exercida per la fentolamina es deu a altres efectes a nivell molecular, diferents dels paràmetres analitzats.

Altres estudis previs i sense publicar del nostre laboratori, van avaluar els efectes de la fentolamina en cèl·lules de neuroblastoma *SH-SY5Y* deficientes en *DJ-1*. Aquestes cèl·lules presenten una disminució en l'activitat de SERCA, un transportador de membrana encarregat d'interioritzar calci al reticle endoplasmàtic. Tant en mosques mutants *DJ-1 β* com en les cèl·lules *SH-SY5Y* abans nombrades, a causa de la carbonilació de la proteïna es disminueix la seua funció (Solana-Manrique et al., 2021). La fentolamina va augmentar l'activitat de la SERCA en les cèl·lules, disminuint els nivells de carbonilació de la proteïna. En aquest cas, la fentolamina podria estar involucrada en el metabolisme del calci i l'estrès de reticle endoplasmàtic, paràmetres que no s'han determinat en aquest estudi.

Una vegada avaluat l'efecte de la fentolamina, passarem a avaluar els efectes del segon compost. L'escopoletina (6-metoxi-7-hidroxycoumarina) és un fitoquímic àmpliament distribuït en plantes com *Scopolia carniolica*, *Morinda citrifolia* (*noni*), *Artemisia annua* i altres plantes medicinals o comestibles. És una molècula petita amb capacitat de travessar membranes cel·lulars, i els seus grups hidroxil i metoxi li confereixen la seua activitat antioxidant. Regula diferents molècules diana donant diferents respostes com la capacitat antioxidant, antiinflamatòria, neuroprotectora, antidiabètica, hepatoprotectora i anticancerígena (en models *in vitro*) (Parama et al., 2022).

Aquest estudi ha demostrat que l'escopoletina pot exercir, en el model de la MP, efectes beneficiosos a través de diferents mecanismes. Començant amb l'estrès oxidatiu, treballs previs han demostrat una disminució dels nivells d'aquesta condició patològica en cèl·lules humanes *SH-SY5Y* (*in vitro*) i en ratolins (*in vivo*) tractats amb escopoletina (Parama et al., 2022). A més, en altre model de *Drosophila* de la MP (*park¹³*) es va observar un augment de la seua capacitat motora i supervivència a més de una recuperació de neurones dopaminèrgiques, una disminució de la peroxidació lipídica i un augment dels nivells de glutatió reduït. Diversos estudis han determinat que actua activant la via Nrf2/ARE donant lloc a la transcripció de gens antioxidants com *SOD* (superòxid dismutasa) i *CAT* (catalasa), a més del precursor del GSH (glutatió reduït) que augmenten la defensa front els ROS (Sakthivel et al., 2022; Gay et al., 2020). Els nostres resultats van en línia amb aquests, ja que vam observar una disminució dels nivells de H₂O₂, molècula participant en el pool total de ROS, i un augment de la ratio GSH/GSSG. Tanmateix, aquests canvis no van resultar en una disminució dels nivells de carbonilació de les proteïnes. Això podria indicar que, tot i la millora en els paràmetres redox més immediats, els danys oxidatius acumulats a llarg termini, són més difícils de revertir.

Després es va determinar si l'escopoletina mostrava efectes sobre la funció mitocondrial. En altres estudis, s'ha demostrat que algun dels efectes de l'escopoletina en aquest òrganul, seria inhibir l'apoptosi via mitocondrial (Gao et al., 2024). Els nostres resultats indiquen que aquest compost provoca l'augment significatiu dels nivells d'ATP.

Per últim, vam determinar els efectes en el metabolisme de la glucosa. L'escopoletina també va augmentar significativament els nivells de glucogen. S'ha vist que podria potenciar la senyalització del receptor d'insulina, fosforilant la tirosina de IRS-1 i activant la via PI3K/Akt (Jang et al., 2020), que en última instància inhibiria la GSK3 β , un inhibidor de la glicogen sintasa. Paral·lelament, que els nivells d'ATP augmenten significativament, podria explicar que les reserves de glicogen s'utilitzarien per obtenir energia.

En aquest estudi buscàvem avaluar els efectes a nivell molecular de dos compostos amb potencial terapèutic front la MP. Per això, vam dur a terme diferents assajos per determinar si fenotips associats a la malaltia es suprimien. Obtenir els efectes d'un compost ens indica la conseqüència final d'una sèrie de rutes de senyalització i per tant caldria determinar el mecanisme d'acció responsable dels efectes.

Per finalitzar, podríem comparar els efectes mostrats per les dos molècules d'estudi, la fentolamina i l'escopoletina. A nivell de capacitat relativa d'escalada, l'escopoletina va mostrar una millora en la funció locomotora major que la fentolamina. Al mateix temps, dels assajos realitzats, la molècula que va mostrar tenir més efectes significatius en els fenotips, va ser l'escopoletina. Aquesta va induir canvis en l'estrès oxidatiu, la funció mitocondrial i el metabolisme de la glucosa. Mentre que la fentolamina no va mostrar efectes en els dos primers. Aquestes dades no descartarien la fentolamina com a molècula amb potencial terapèutic sinó que indiquen que els canvis locomotors es deuen a altres mecanismes que no hem considerat en aquest estudi amb mosques.

En conseqüència, de les dues molècules, com l'escopoletina és la que presenta més canvis fenotípics significatius, seria interessant en un futur determinar diferents mecanismes d'acció en el model de MP de *Drosophila melanogaster* (Figura 7).

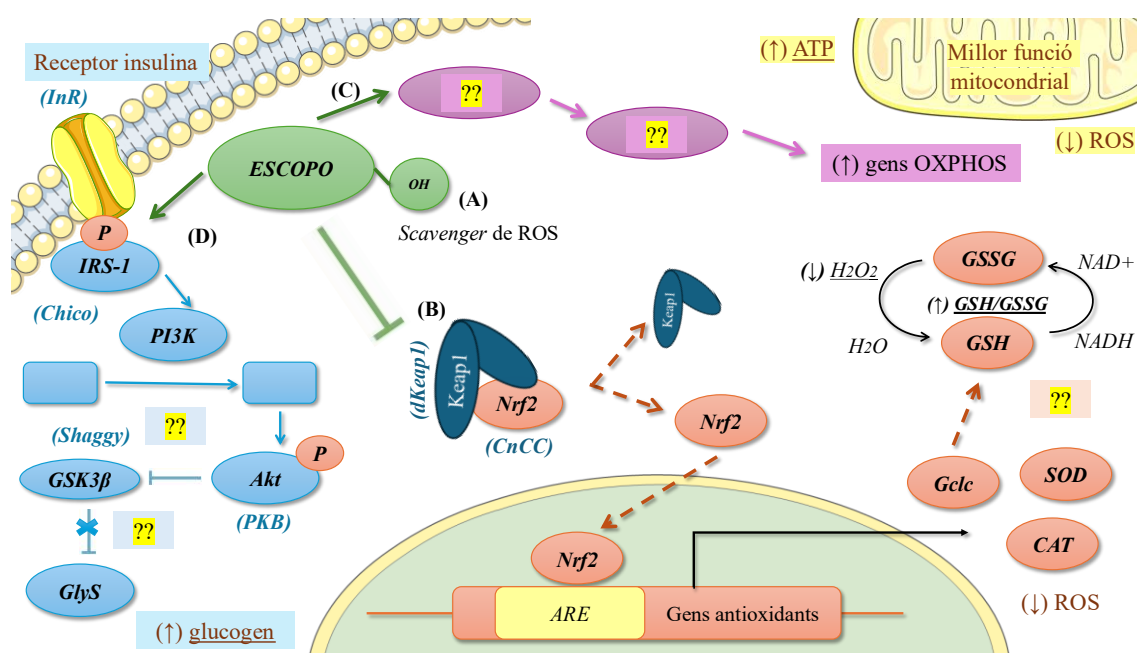


Figura 7. Possibles mecanismes d'acció de l'escopoletina en el model de la MP en *Drosophila melanogaster* mutant en DJ-1β. **Efecte sobre l'estrès oxidatiu:** (A) Defensa antioxidant directa com Scavenger de ROS; (B) Activació de la via Nrf2/ARE que permet l'expressió de gens antioxidants i la regeneració del glutatió reduït a partir del peròxid. **Efecte sobre la disfunció mitocondrial:** (C) Expressió de gens OXPHOS que augmentarien els nivells d'ATP. **Efecte sobre el metabolisme de la glucosa:** (D) Augment dels nivells de glucogen a partir de l'activació de la via PI3K/Akt, la inhibició de GSK3β i l'acció de la glicogen sintasa. (Els gens entre parèntesi corresponen al nom que reben aquests en *Drosophila melanogaster*). [Algunes de les icones de la Figura 7 pertanyen a la plataforma Medical Art.]

8. PERSPECTIVES FUTURES

Els resultats abans exposats donen suport a la nostra hipòtesi inicial i mostren efectes beneficiosos no solament en l'assaig d'escalada sinó a nivell molecular en el model de *Drosophila melanogaster* mutant en *DJ-1 β* . Tanmateix, cal aprofundir més en els possibles efectes dels compostos ja que les propietats de cada un donen lloc a diferents respostes i poden no ser les que hem avaluat en aquest estudi.

Per altra banda, cada model biomèdic pot respondre diferent a un mateix compost. Tot i que *Drosophila* presenta clars avantatges en quant a rapidesa, manipulació genètica i conservació de vies metabòliques, els resultats podrien no ser extrapolables a un model més proper a l'humà. Per això, caldria fer aquesta avaluació de trets fenotípics en models cel·lulars humans com les *SH-SY5Y*. De la fentolamina si que en disposem d'alguns resultats en cèl·lules però, de l'escopoletina encara no s'ha avaluat. El tractament de les cèl·lules amb aquest segon compost i la determinació de paràmetres relacionats amb la viabilitat cel·lular, l'estrès oxidatiu i la funció mitocondrial, aportaria dades complementàries.

A més, els compostos podrien tenir més dianes terapèutiques a banda de les descrites i que podrien no haver sigut descobertes encara. A més de que les vies proposades en el cas de l'escopoletina no poden ser confirmades únicament determinant els efectes. S'hauria de buscar l'efecte en altres fenotips de *Drosophila melanogaster* associats amb la MP. Per tant, solament hem proposat un mecanisme que dona la possibilitat de investigar noves vies relacionades amb la MP utilitzant models biomèdics.

9. CONCLUSIÓ

Atenent els resultats anteriors podríem afirmar que els dos candidats identificats al HTS no sols milloren la capacitat locomotora, sinó que ho fan exercint diferents efectes a nivell molecular.

Al principi d'aquest Treball final de grau vam establir dos objectius per aconseguir respondre la hipòtesi. En aquest punt podem concloure que:

1. Els compostos han presentat la capacitat de modificar trets fenotípics associats a la MP utilitzant mosques mutants en *DJ-1 β* . Dels assaigs realitzats en el laboratori, l'escopoletina va mostrar més canvis fenotípics significatius en comparació amb la fentolamina, indicant que, els efectes responsables de la millora locomotora, són diferents per a cada compost.
2. A partir dels nostres resultats i de la literatura existent es podrien proposar possibles mecanismes d'acció dels compostos en el cas de l'escopoletina. Per així, en un futur estudiar les vies implicades en el mutant *Drosophila melanogaster* o en altres models biomèdics.

En resum, dels possibles efectes que pot exercir la fentolamina en el model de MP de *Drosophila melanogaster*, sembla ser que es relacionen amb el metabolisme de la glucosa. En canvi, els efectes de l'escopoletina s'associarien a la millora de l'estrès oxidatiu, la funció mitocondrial i el metabolisme de la glucosa.

10. BIBLIOGRAFIA

- Alqahtani, T., Deore, S. L., Kide, A. A., Shende, B. A., Sharma, R., Dadarao Chakole, R., Nemade, L. S., Kishor Kale, N., Borah, S., Shrikant Deokar, S., Behera, A., Dhawal Bhandari, D., Gaikwad, N., Kalam Azad, A., & Ghosh, A. (2023). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease, and Parkinson's disease, Huntington's disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis -An updated review. In *Mitochondrion* (Vol. 71, pp. 83–92). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2023.05.007>
- Ben-Shlomo, Y., Darweesh, S., Llibre-Guerra, J., Marras, C., San Luciano, M., & Tanner, C. (2024). The epidemiology of Parkinson's disease. In *The Lancet* (Vol. 403, Issue 10423, pp. 283–292). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01419-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01419-8)
- Bloem, B. R., Okun, M. S., & Klein, C. (2021). Parkinson's disease. In *The Lancet* (Vol. 397, Issue 10291, pp. 2284–2303). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00218-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00218-X)
- 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>
- Dai, C., Tan, C., Zhao, L., Liang, Y., Liu, G., Liu, H., Zhong, Y., Liu, Z., Mo, L., Liu, X., & Chen, L. (2023). Glucose metabolism impairment in Parkinson's disease. In *Brain Research Bulletin* (Vol. 199). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2023.110672>
- Day, J. O., & Mullin, S. (2021). The genetics of parkinson's disease and implications for clinical practice. In *Genes* (Vol. 12, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/genes12071006>
- Dionísio, P. A., Amaral, J. D., & Rodrigues, C. M. P. (2021). Oxidative stress and regulated cell death in Parkinson's disease. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 67). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101263>
- Dong-Chen, X., Yong, C., Yang, X., Chen-Yu, S. T., & Li-Hua, P. (2023). Signaling pathways in Parkinson's disease: molecular mechanisms and therapeutic interventions. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 8, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01353-3>
- Gao, X. Y., Li, X. Y., Zhang, C. Y., & Bai, C. Y. (2024). Scopoletin: a review of its pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 15). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1268464>
- Jang, J. H., Park, J. E., & Han, J. S. (2020). Scopoletin increases glucose uptake through activation of PI3K and AMPK signaling pathway and improves insulin sensitivity in 3T3-L1 cells. *Nutrition Research*, 74, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2019.12.003>
- Lind-Holm Mogensen, F., Scafidi, A., Poli, A., & Michelucci, A. (2023). PARK7/DJ-1 in microglia: implications in Parkinson's disease and relevance as a therapeutic target. In *Journal*

of Neuroinflammation (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12974-023-02776-z>

- Messaoudi, N., Gautier, V., Kthiri, F., Lelandais, G., Mihoub, M., Joseleau-Petit, D., Caldas, T., Bohn, C., Tolosa, L., Rao, G., Tao, K., Landoulsi, A., Bouloc, P., & Richarme, G. (2013). Global Stress Response in a Prokaryotic Model of DJ-1-Associated Parkinsonism. *Journal of Bacteriology*, 195(6), 1167–1178. <https://doi.org/10.1128/JB.02202-12>
- Panicker, N., Ge, P., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2021). The cell biology of Parkinson's disease. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 220, Issue 4). Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1083/jcb.202012095>
- Parama, D., Girisa, S., Khatoon, E., Kumar, A., Alqahtani, M. S., Abbas, M., Sethi, G., & Kunnumakkara, A. B. (2022). An overview of the pharmacological activities of scopoletin against different chronic diseases. In *Pharmacological Research* (Vol. 179). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2022.106202>
- 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>
- Sakthivel, K. M., Vishnupriya, S., Dharshini, L. C. P., Rasmi, R. R., & Ramesh, B. (2022). Modulation of multiple cellular signalling pathways as targets for anti-inflammatory and anti-tumorigenesis action of Scopoletin. In *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (Vol. 74, Issue 2, pp. 147–161). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgab047>
- Sanchis, I. (2024) “Evaluación del potencial terapéutico de dos inhibidores de histonas desacetilasas en modelos biomédicos de la Enfermedad de Parkinson”. TFG Universitat de València.
- Sanz, F. J., Solana-Manrique, C., Lilao-Garzón, J., Brito-Casillas, Y., Muñoz-Descalzo, S., & Paricio, N. (2022). Exploring the link between Parkinson's disease and Diabetes Mellitus in Drosophila. <https://doi.org/10.1101/2022.02.18.481049>
- 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., & Paricio, N. (2022). Disease-modifying effects of Vincamine supplementation in Drosophila and human cell models of Parkinson's disease. <https://doi.org/10.1101/2022.12.28.522104>
- Sanz, F. J., Solana-Manrique, C., Torres, J., Masiá, E., Vicent, M. J., & Paricio, N. (2021). A High-Throughput Chemical Screen in DJ-1 β Mutant Flies Identifies Zaprinas as a Potential Parkinson's Disease Treatment. *Neurotherapeutics*, 18(4), 2565–2578. <https://doi.org/10.1007/s13311-021-01134-2>

- Sardana, D., Lee, J., Yiu, C. K., & Li, K. Y. (2023). effectiveness of phentolamine mesylate in reversal of local anesthesia: systematic review and meta-analysis. *Journal of Evidence-Based Dental Practice*, 23(3), 101861. <https://doi.org/10.1016/j.jebdp.2023.101861>
- 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 - Molecular Basis of Disease*, 1867(7). <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166152>
- Solana-Manrique, C., Sánchez-Pérez, A. M., Paricio, N., & Muñoz-Descalzo, S. (2025). Two- and Three-Dimensional In Vitro Models of Parkinson's and Alzheimer's Diseases: State-of-the-Art and Applications. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 26, Issue 2). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms26020620>
- 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*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/cells11030331>
- Xiao, C., Markello, T., Zein, W. M., Bishop, R., Groden, C., Gahl, W., & Toro, C. (2021). PARK7-Related Early Onset Parkinson Disease in the Setting of Complete Uniparental Isodisomy of Chromosome 1. *Neurology: Genetics*, 7(4). <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000606>
- Ye, H., Robak, L. A., Yu, M., Cykowski, M., & Shulman, J. M. (2023). Genetics and Pathogenesis of Parkinson's Syndrome. In *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* (Vol. 18, pp. 95–121). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-031521-034145>

11. AUTOAVALUACIÓ

La valoració de la meua estança en el grup de recerca de Genètica Molecular del Desenvolupament i Models Biomèdics (GMDMB) ha estat positiva. He pogut reforçar les meues habilitats pràctiques en el laboratori, tant com recordar conceptes sobre genètica donats a les classes teòriques de la Universitat.

D'aquestes pràctiques esperava aprendre sobre els models biomèdics i el seu ús en recerca. Efectivament, he après sobre el manteniment i manipulació de *Drosophila melanogaster* i de cèl·lules humanes de neuroblastoma humà *SH-SY5Y*. Les diferents tasques realitzades m'han permès realitzar una avaluació del potencial terapèutic front la malaltia de Parkinson de dos compostos en el model de mosca mutant en *DJ-1 β* . Fet que es pot observar en aquest Treball Final de Grau.

Amb aquesta experiència m'he adonat de com d'important és conèixer l'organisme amb el que estàs treballant. Petites errades en el maneig de les mosques poden provocar canvis que alterarien els resultats finals. A més, tot i que les rutes de senyalització dels organismes models solen estar ben caracteritzades, l'efecte dels compostos testats pot donar efectes diferents entre organismes. Aquest fet dificulta determinar l'efecte terapèutic d'un compost ja que els resultats obtinguts podrien no ser extrapolables a models més pareguts als humans.

Aquest treball m'ha permès veure com es tradueixen els coneixements del grau en tasques habituals en el món de la recerca. A més, he pogut aprendre de professionals que han compartit amb mi els seus coneixements i m'han ensenyat a contribuir en l'estudi de malalties a partir de models biomèdics.

12. ANNEX

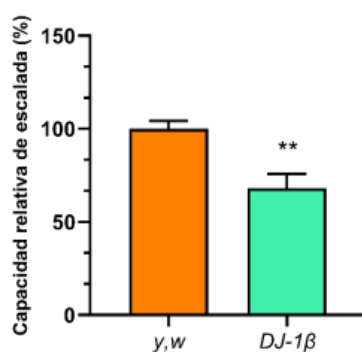
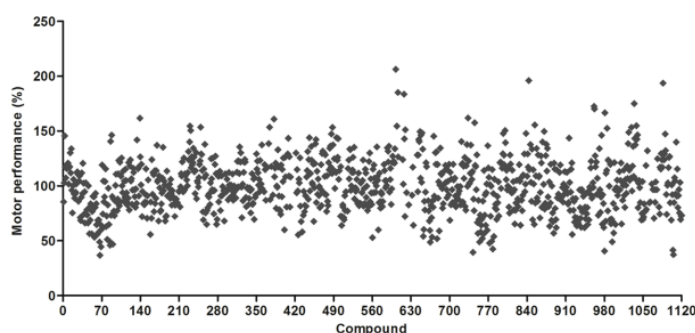


Figura 1. Capacitat d'escalada de mosques (%) y,w i DJ-1β de 5 dies d'edat, sense tractament. Amb valors es troben referenciats als nivells d'escalada de mosques y,w. Imatge estreta del TFG amb títol “Evaluación del potencial terapéutico de dos inhibidores de histonas desacetilasas en modelos biomédicos de la Enfermedad de Parkinson” (Sanchis, I. et al., 2024).

(A)



(B)

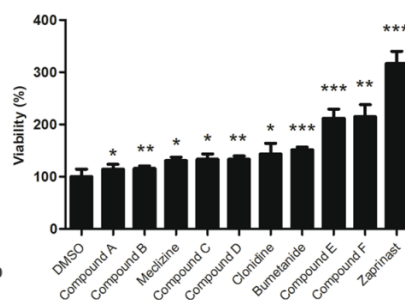


Figura 2. HTS i validació dels compostos amb potencial terapèutic front la MP. (A) Rendiment motor de les mutacions DJ-1β obtingudes durant l'HTS primari per als 1120 fàrmacs avaluats analitzats mitjançant assaigs d'escalada. (B) La viabilitat de les cèl·lules deficientes DJ-1 es va mesurar mitjançant assajos MTT en presència d'estrès oxidatiu (induït amb 100 μM H₂O₂) i es va tractar amb els deu compostos seleccionats. Imatge estreta de l'article “A High-Throughput Chemical Screen in DJ-1β Mutant Flies Identifies Zaprinas as a Potential Parkinson's Disease Treatment” (Sanz et al., 2021).

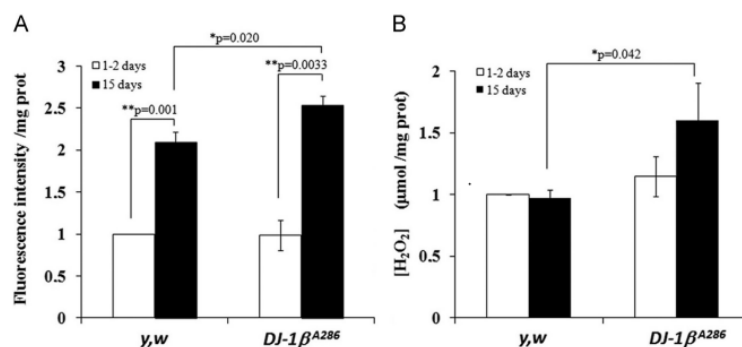


Figura 3. Anàlisi dels nivells de ROS en mosques mutants y, w i DJ-1β. (A) La producció global de ROS es va avaluar mitjançant la sonda fluorescent DCFH-DA en extractes totals de mosca. (B) Els nivells de producció d'H₂O₂ es van analitzar mitjançant la sonda vermella fluorescent Amplex (Invitrogen). Imatge estreta de l'article "Antioxidant compound supplementation prevents oxidative damage in a Drosophila model of Parkinson disease" (Casani et al., 2013).

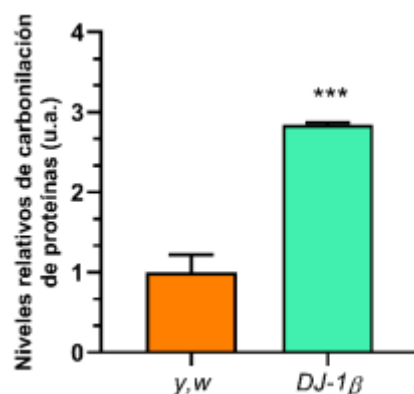


Figura 4. Nivells de carbonilació de proteïnes de y,w i DJ-1β de 5 dies d'edat, sense tractament. Amb valors es troben referenciats als nivells d'escalada de mosques y,w. Imatge estreta del TFG amb títol "Evaluación del potencial terapéutico de dos inhibidores de histonas desacetilasas en modelos biomédicos de la Enfermedad de Parkinson" (Sanchis, I. et al., 2024).

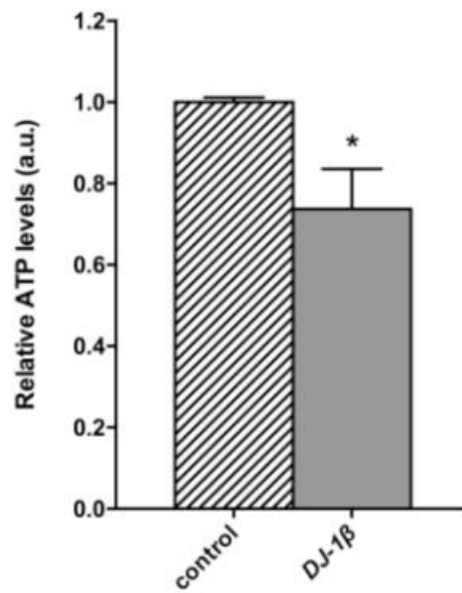


Figura 5. Nivells relatius d'ATP en mosques mutants DJ-1β de 15 dies en comparació amb controls de la mateixa edat. Imatge estreta de l'article "Metabolic Alterations in a Drosophila Model of Parkinson's Disease Based on DJ-1 Deficiency" (Solana-Manrique et al., 2022).

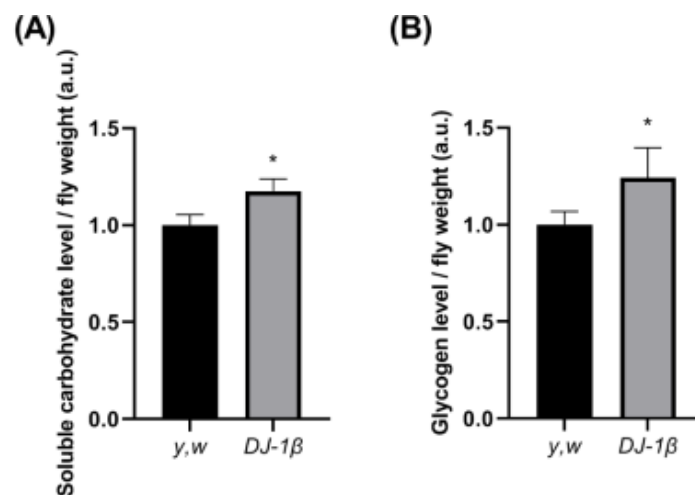


Figura 6. Alteracions metabòliques en mosques model de la MP. (A-B) Es van analitzar els nivells d'hidrats de carbohidrats solubles i de glicogen en mosques mutants DJ-1β de 15 dies mitjançant el mètode de l'antrona per absorbància. Imatge estreta de l'article "Exploring the link between Parkinson's disease and Diabetes Mellitus in Drosophila" (Sanz, Solana-Manrique, Lilao-Garzón, et al., 2022).

AGRAÏMENTS

En primer lloc, voldria agrair a la Dra. Nuria Paricio Ortiz per obrir-me les portes del laboratori i donar-me la possibilitat de col·laborar en el seu grup de recerca. Gràcies a ella i a Cristina Solana per ensenyar-me el món dels models biomèdics, i la importància del seu ús en la investigació de malalties. La seua dedicació i guia han estat fonamentals en tot moment. També voldria donar les gràcies a Alessia Lambiase per acompanyar-me en l'aprenentatge de noves tècniques.

Gràcies a totes les persones que he conegut al llarg dels cinc anys que he passat a Tarragona. Gràcies als meus amics de la residència per la gran família frutal que hem aconseguit i especialment dedicar-li a certa persona un “Aspaïet”. Gràcies als amics de la Universitat, per compartir tantes hores de classe i la passió per la Biotecnologia i la Bioquímica. Gràcies també als amics de tota de la vida i que malgrat de la distància han estat presents.

Per últim, agrair especialment a la meua família, als meus pares i al meu germà pel seu suport incondicional. Per ensenyar-me que tot esforç val la pena i que, tot i que les coses poden eixir malament, tinc la capacitat suficient per assolir el meus propòsits. Gràcies per donar-me els recursos i les eines per poder complir les meues aspiracions i facilitar el meu camí. “Ohana significa família i família significa que estarem junts sempre”.

Aquest Treball Final de grau va dedicat a tots vosaltres.