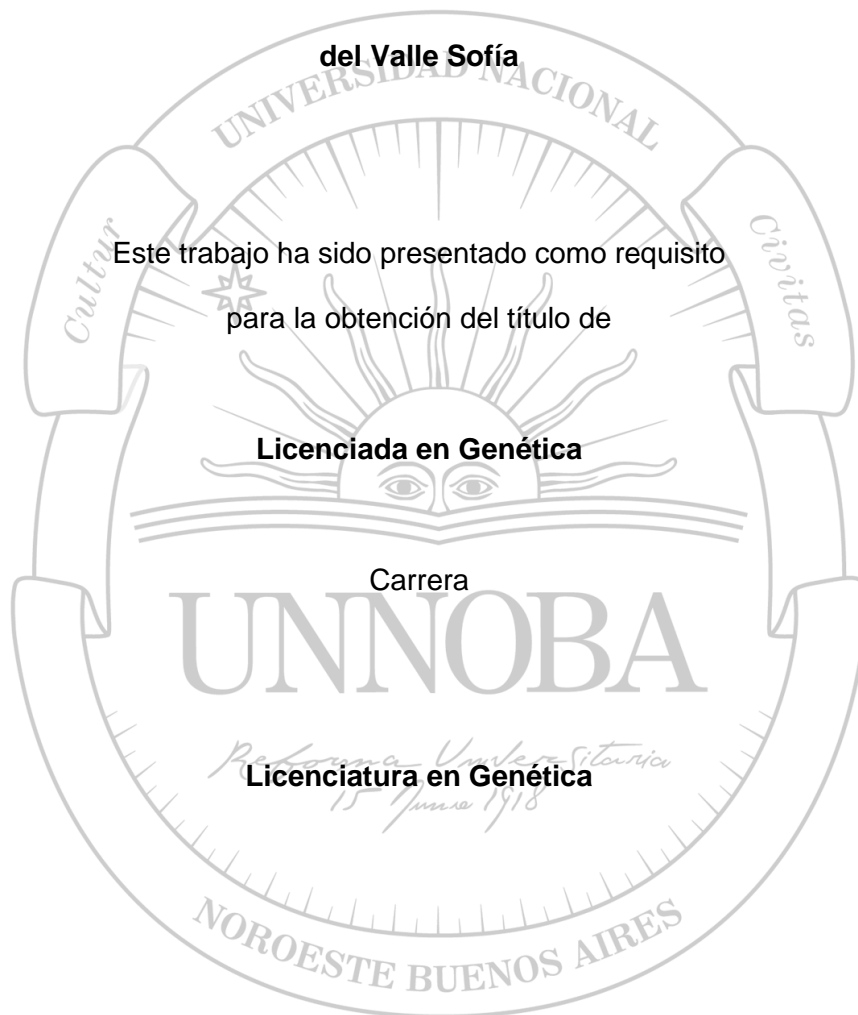


**CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS CARDÍACOS EN UN MODELO
GENÉTICO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON. CANNABIS COMO POSIBLE
TERAPIA.**

Trabajo Final de Grado

de la alumna

del Valle Sofía



Este trabajo ha sido presentado como requisito
para la obtención del título de

Licenciada en Genética

Carrera

UNNOBA

Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 5 de julio.

**CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS CARDÍACOS EN UN MODELO
GENÉTICO DE ENFERMEDAD DE PARKINSON. CANNABIS COMO POSIBLE
TERAPIA.**

Trabajo Final de Grado

de la alumna

del Valle Sofía

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador/a

(Nombre y Apellido)
Evaluador/a

(Nombre y Apellido)
Evaluador/a

Paola Ferrero
Co-Directora

Manuela Santalla
Directora

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 5 de julio.

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a la UNNOBA por haberme dado la oportunidad de formarme académicamente, brindándome educación de calidad. Sin la Universidad Pública llegar hasta acá hubiera sido imposible.

Al CIC por haberme recibido tan cálidamente y permitirme llevar a cabo este trabajo final de grado.

A la Fundación Instituto Leloir por haber donado las moscas parkinsonianas, protagonistas en esta investigación.

Y al equipo de PlantAr Ciencia, por su energía y predisposición, quienes nos donaron a Juanita.

En segundo lugar, a mi equipo de trabajo, para el cual no encuentro palabras que logren expresar lo agradecida que estoy con cada persona que lo conforma, es especial por la paciencia, por haberme incluido desde el minuto cero y por enseñarme que nada tiene mejores resultados que el trabajo en equipo. A Ale, por su enorme predisposición con quien fuimos a trabajar incluso sábados y domingos. A Ivi, quien hizo que la rutina sea más amena, mi compañera de mesada, de risas, almuerzos y canciones, por haberme enseñado tanto durante estos meses, no solo académicamente sino también en la vida. Y a quien dirigió de manera impecable este trabajo, una persona que admiro mucho, mi directora, la Dra. Manuela Santalla. Gracias por guiarme, por estar conmigo en el laboratorio enseñándome pasito a pasito, por ayudarme a pensar, por enseñarme a decidir y sobre todo a resolver lo que sea que se presente en el camino. Quien hizo lo posible y hasta lo imposible para lograr tanto en tan poco tiempo y en contexto pandémico. Gracias también por haber sido muchas veces una contención emocional, por sus consejos, por las tardes de placita con Iri y por confiar en mí.

Ninguno de estos meses hubieran sido iguales sin mi familia porteña y platense, quienes me hicieron sentir en casa y estuvieron conmigo apoyándome, sosteniéndome, compartiendo miles de momentos inolvidables. Gracias por el amor, el día a día y por aceptarme sin más.

Agradezco también a mis compañeros de cursada por las vivencias de todos estos años, con quienes aprendí mucho más que genética. En especial agradecer a las amistades que me regaló esta carrera, Jaz, Magui, Li y Juani, por haber hecho este camino más fácil y divertido, quienes entendieron de alegrías, frustraciones, tristezas y festejos, por los días eternos de estudio y mates, sin ellos hubiera sido realmente muy difícil.

También a mis amistades y vínculos de la vida, quienes estuvieron siempre apoyando y conteniéndome, cerquita o lejos, de cualquier modo siempre lograron estar presente durante todos estos años y en especial en este último tiempo, para llenarme de amor, confianza y para hacerme sentir siempre en un lugar cálido y seguro.

Y por último pero lejos de ser lo menos importante, agradecer a mi familia quienes estuvieron desde el minuto cero conmigo, por la incondicionalidad, por el amor inmenso, por festejar cada paso logrado, por no dudar nunca y darme siempre el empujón y aliento que necesitaba antes de cada decisión tomada. Por mantener siempre intacto calor de casa cada vez que vuelvo, por cada abrazo y por ser el sostén más importante que me acompañó siempre.

A todas estas personas, gracias por confiar en mí incluso cuando yo no pude hacerlo y por ayudarme a creer que sí puedo.

Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) es una de las enfermedades neurodegenerativas progresivas más frecuentes en humanos. Se da a causa de la muerte progresiva de neuronas dopaminérgicas del cerebro. Si bien no es claro el motivo de la muerte neuronal en esta región, una de las posibles causas es el aumento del estrés oxidativo como consecuencia de una disfunción mitocondrial característica en pacientes que padecen esta enfermedad.

Se ha demostrado que pacientes que presentan EP tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, siendo la insuficiencia cardíaca la principal causa de muerte prematura en pacientes con EP.

La mayoría de los casos de EP se dan de manera esporádica pero alrededor de un 5-10% de los casos totales pueden atribuirse a causas genéticas, denominándose este tipo de EP parkinsonismo familiar. Se han identificado tres genes de herencia autosómica recesiva que causan parkinsonismo familiar con inicio temprano, *PINK1*, *PARK2*, y *PARK7*. *PARK7* codifica a una pequeña proteína de expresión ubicua denominada DJ-1, implicada en una gran cantidad de funciones relacionadas con la citoprotección y mantenimiento mitocondrial. Además, se ha propuesto a DJ-1 como un posible blanco terapéutico importante para la cardioprotección.

En este trabajo se estudió el efecto a nivel cardíaco de la delección sistémica de DJ-1 β en un modelo genético de EP en *Drosophila melanogaster*. Nuestros resultados muestran que esta delección produce un fenotipo parkinsoniano a nivel motor y un deterioro en la función cardíaca en moscas con EP.

Por otro lado, los tratamientos actuales para la EP resultan efectivos mejorando la función motora, pero el consumo crónico de los mismos generan efectos secundarios, entre ellos problemas cardiovasculares. Por eso estudiamos el efecto de una cepa de cannabis alta en CBD, tratamiento alternativo ampliamente difundido entre los pacientes con EP. Encontramos que los síntomas tanto a nivel motor como cardíaco producidos por la delección sistémica de DJ-1 β fueron revertidos con el tratamiento con vapor de cannabis.

En conjunto, los resultados del presente Trabajo Final de Grado demuestran que en la EP familiar producida por la delección de DJ-1 β se manifiesta un deterioro cardíaco y, que el tratamiento con una cepa de cannabis alta en CBD resulta efectivo para tratar los síntomas de la EP.

Se demostró que pacientes eligen el CBD de manera alternativa como tratamiento, encontrando una disminución de los síntomas y una mejora en la calidad de vida. Investigaciones en animales evidenciaron que los cannabinoides ofrecen propiedades neuroprotectoras suprimiendo daños oxidativos que tienen como consecuencia la degeneración de las neuronas dopaminérgicas y de cardioprotección. Y

que estos síntomas pueden ser tratados con vapor de cannabis, ya que luego de un tratamiento crónico se encontraron disminuidos.

ÍNDICE

Introducción	1
La enfermedad de Parkinson	2
Genética de la enfermedad de Parkinson.	3
Mitocondria y DJ-1	4
Parkinson y corazón	6
Terapias actuales para EP.....	8
Cannabis como posible terapia.....	9
<i>D. melanogaster</i> como organismo modelo	10
Hipótesis y objetivos	101
Materiales y métodos	12
Mantenimiento y amplificación de <i>stocks</i>	13
Tratamiento con cannabis	13
Caracterización fenotípica.....	15
Función cardíaca.	15
Estado mitocondrial	17
-Aislamiento mitocondrial	17
-Evaluación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_{mit}$)	18
RT- PCR de DJ-1	21
-Diseño de primers:.....	21
-Extracción de ARN:.....	22
RT-PCR.....	23
Análisis estadístico.....	24
Resultados	25
La delección de la isoforma β de DJ-1 produce un fenotipo parkinsoniano en <i>Drosophila melanogaster</i>	26
La delección de la isoforma β de DJ-1 provoca un detrimento en la función cardíaca. ..	26
Las moscas con EP no presentan cambios en el potencial de membrana mitocondrial .	30
La isoforma β de DJ-1 se expresa en el corazón de <i>Drosophila melanogaster</i>	32
El tratamiento crónico con cannabis mejora la capacidad de escalado de las moscas park.....	34
El tratamiento con cannabis ayuda a mejorar parcialmente la función cardíaca en moscas con EP.....	34
Discusión	36
Conclusión	40
Bibliografía	42

Introducción

La enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es una de las enfermedades neurodegenerativas progresivas más frecuentes en humanos (Rodrigues et al., 2019). Se trata de una enfermedad crónica que se caracteriza por provocar movimientos corporales involuntarios, siendo los síntomas principales el temblor, bradisinecia (ralentización de los movimientos), rigidez (los músculos permanecen tensos y contraídos de manera constante) e inestabilidad postural (pérdida de equilibrio) (Aminoff, 2003). Además de los síntomas motores pueden manifestarse síntomas psiquiátricos tales como depresión, demencia y alucinaciones (Surmeier et al., 2012). Tiene una prevalencia del 0,3% de la población total, y aproximadamente un 1 % en adultos mayores de 60 años, llegando a un 4% en adultos mayores de 80 años (de Lau et al., 2006).

Este trastorno del sistema motor aumenta severamente con el tiempo a causa de la muerte progresiva de neuronas situadas en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) del cerebro. Estas neuronas se caracterizan por estar involucradas en la regulación motora y por secretar dopamina en sus terminales axónicos. La deficiencia de estas neuronas y, por lo tanto, de este neurotransmisor culmina en una actividad cerebral anormal, generada por una degeneración de las neuronas esenciales para llevar a cabo una coordinación normal del movimiento (Surmeier et al., 2012). Si bien no es claro el motivo de la muerte neuronal en esta región, una de las posibles causas planteadas es el aumento del estrés oxidativo, el cual se define como: el desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS por sus siglas en inglés, *reactive oxygen species*) y la eliminación de intermediarios tóxicos por los sistemas antioxidantes. Este aumento del estrés oxidativo se da como consecuencia de una disfunción mitocondrial característica en pacientes que padecen esta enfermedad (Keeney et al., 2006). Actualmente, la disfunción mitocondrial es la principal causa aparente de la EP. Esto se debe a que las mitocondrias tienen un papel fundamental en la producción de energía y en la regulación del estrés oxidativo, lo que resulta primordial para la supervivencia neuronal.

La mayoría de los casos de EP se dan de manera esporádica, relacionados con el envejecimiento y con la exposición a factores ambientales tales como la exposición a estrés o ciertas toxinas como herbicidas o pesticidas. Estos factores contribuyen a la formación de oligómeros y fibrillas de α -sinucleína característica de este trastorno motor. El agregado de esta proteína se acumula formando los llamados cuerpos de Lewy dentro de las neuronas cerebrales, lo que resulta tóxico para las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales (Rocha y Morrison, 2020).

Por otro lado, alrededor de un 5-10% de los casos totales de esta enfermedad pueden atribuirse a causas genéticas, ya que se sabe que mutaciones específicas en ciertos genes generan parkinsonismo (Mounsey y Teismann, 2011). Este tipo de EP es poco común y se lo denomina parkinsonismo familiar, teniendo la particularidad de presentar síntomas a temprana edad, antes de los 50 años (Cookson, 2012).

Genética de la enfermedad de Parkinson.

Se han identificado tres genes de herencia autosómica recesiva que causan parkinsonismo familiar con inicio temprano, estos son: *PINK1*, *PARK2*, y *PARK7*. Este tipo de parkinsonismo difiere de la EP esporádica ya que, si bien hay pérdida de neuronas dopaminérgicas, no es característica la presencia de cuerpos de Lewy en ellas (Cookson, 2012). Sin embargo, lo que converge entre el parkinsonismo idiopático y el genético es la disfunción mitocondrial y la presencia de estrés oxidativo. La función de las proteínas codificadas por estos tres genes radica en el mantenimiento de la función mitocondrial normal de las neuronas dopaminérgicas protegiéndolas contra el estrés oxidativo, mediando la mitofagia y previniendo la apoptosis (Mukherjee et al 2015). *PARK2* codifica una proteína denominada Parkin. Parkin es una ubiquitina ligasa E3 que en condiciones basales se encuentra en el citosol donde se inhibe su actividad de ubiquitinización. En presencia de estrés, Parkin se dirige a las mitocondrias dañadas y cumple su función gracias al previo reclutamiento de la quinasa 1 inducida por PTEN (Pink1) codificada por el gen *PINK1*. Esta última logra estabilizarse sobre la membrana mitocondrial externa gracias a la despolarización del potencial mitocondrial causado por el daño en esta organela. En conjunto, ambas proteínas generan la activación de la mitofagia de mitocondrias dañadas (Mukherjee et al., 2015) (Figura 1).

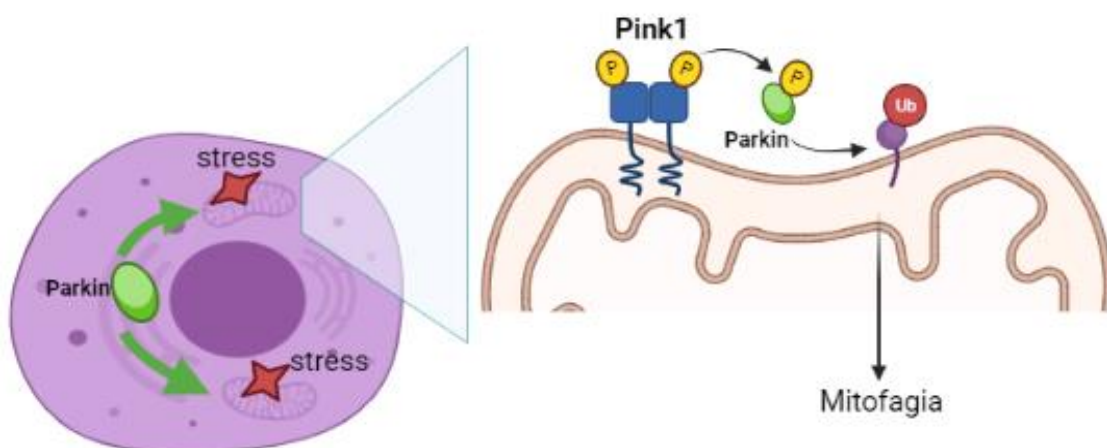


Figura 1. Acción en conjunto de Pink1 y Parkin en la regulación de la autofagia mitocondrial. En presencia de estrés mitocondrial Parkin se direcciona a estas organelas donde es fosforilada por Pink1 lo cual activa su función de ubiquitinización que culmina en mitofagia.

Por su parte, *PARK7* codifica a una pequeña proteína denominada DJ-1 que se encuentra altamente conservada en varias especies (Bandyopadhyay y Cookson, 2004). Se ha demostrado que se expresa de manera ubicua en varios tejidos humanos incluido el páncreas, riñón, músculo esquelético, hígado, testículo, cerebro y corazón (Smith y Wilson, 2017). Esta proteína no solo está fuertemente relacionada con la EP (Bonifati, 2003) sino también en patologías como enfermedades inmunes e inflamatorias, diabetes tipo II, cáncer e infertilidad masculina (Zhang et al., 2020). Se trata de un producto proteico dimerico, de 20kDa de único dominio y multifuncional (Tao y Tong, 2003)

involucrado en varias vías de transcripción y traducción, eliminación de ROS y mantenimiento mitocondrial, además de funcionar como chaperona, proteasa y enzima molecular (Zhang et al., 2020).

DJ-1 presenta diversas funciones relacionadas con la citoprotección neuronal tales como: **propiedades antioxidantes**, ya que en presencia de estrés oxidativo el residuo Cys-106 de la proteína se oxida resultando en la formación de ácido cisteína sulfínico, lo cual resulta crítico para su traslocación mitocondrial y efecto neuroprotector (Canet-Avilés et al. ., 2004); **efectos antiapoptóticos**, ya que cuando esta proteína se encuentra en el núcleo evita la activación de proteínas proapoptótica (Im et al., 2010); **función mitocondrial**, ya que se demostró que tiene varias funciones en esta organela como mantener el buen funcionamiento de la cadena transportadora de electrones (Thomas et al., 2011) y la morfología mitocondrial, teniendo en cuenta que una alteración de la misma generaría una dinámica mitocondrial alterada lo cual aumentaría la producción de ROS y por ende estrés oxidativo (Irrcher et al., 2010). También se encuentra involucrada en la biogénesis mitocondrial inhibiendo la SUMOilación de un represor de la transcripción, lo que aumenta los niveles de la proteína superóxido dismutasa de manganeso (SOD Mn) que ayuda en la defensa de estrés oxidativo (Zhong y Xu, 2008).

Mitocondria y DJ-1

Las mitocondrias se caracterizan por poseer una membrana mitocondrial externa (MME) y una membrana mitocondrial interna (MMI) separadas entre sí por el espacio intermembrana. En la MMI se encuentra la cadena transportadora de electrones, compuesta por cuatro complejos enzimáticos de los cuales tres de ellos son complejos transmembrana. Estos últimos tienen la capacidad de actuar como bomba de protones gracias a la energía que se genera por el flujo de electrones a lo largo de la cadena respiratoria. Este bombeo de protones se da desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana generando un gradiente clave para la síntesis de ATP realizada por un quinto complejo transmembrana, la enzima ATP sintasa (Figura 2). El potencial de la membrana mitocondrial es el componente principal de la fuerza protón motriz y dará indicios del estado mitocondrial en general (Cooper, 2000).

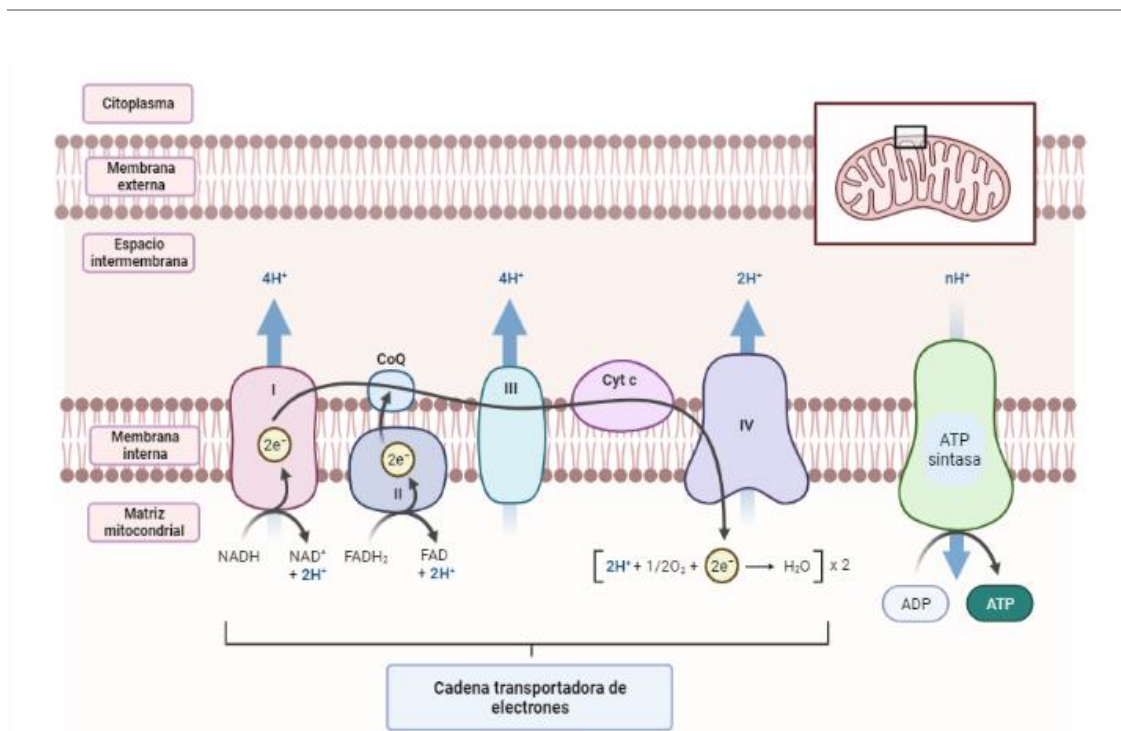


Figura 2. Compartimentos mitocondriales y cadena transportadora de electrones anclada a la membrana mitocondrial interna junto con la ATP sintasa.

Normalmente las mitocondrias generan ROS en niveles basales. Estos niveles basales de ROS cumplen una función de señalización como intermediarios secundarios en vías sensibles a redox. Sin embargo, la producción de ROS puede aumentar de manera drástica si se genera un flujo inverso de electrones a causa de la inhibición de algún complejo de la cadena transportadora de electrones o, si se aumenta la fuga de electrones en caso de hiperpolarización mitocondrial (Angelova y Abramov, 2016). Este aumento produce daño oxidativo del ADN, proteínas y lípidos generando un estado general de estrés oxidativo, teniendo como consecuencia una disfunción mitocondrial (Dolgacheva et al., 2019).

Por todo lo descrito anteriormente, controlar el estrés oxidativo que puede generarse en esta organela resulta de gran importancia para mantener su homeostasis y así su buen funcionamiento, el cual resulta esencial tanto para la generación de energía a través del abastecimiento de ATP a la célula, como de la regulación de la homeostasis celular a través de la apoptosis. Esto cobra aún más relevancia en células que consumen gran cantidad de energía como las neuronas y los miocitos cardíacos.

Las mitocondrias se consideran uno de los principales productores de ROS en la célula, de hecho se ha demostrado que la mayor producción de ROS neuronal en presencia de EP se da a causa de un mal funcionamiento del complejo I de la cadena transportadora de electrones (Adam-Vizi, 2005). A su vez, también se ha evidenciado que DJ-1 se une a las subunidades NDUFA4 y ND1 del complejo I de la cadena transportadora de electrones y mantiene su actividad (Hayashi et al., 2009). Por lo que se podría pensar que la ausencia de esta proteína causada por la mutación del gen

PARK7 podría estar afectando la integridad y buen funcionamiento de este complejo, lo que generaría un aumento significativo en la producción de ROS.

Los fenotipos celulares en ausencia de función de DJ-1 presentan una marcada disfunción mitocondrial mostrando una despolarización en esta organela y acumulación de marcadores de autofagia (Wang et al., 2012). Esto sugiere que esta proteína tiene funciones metabólicas que pueden ser importantes para entender la patogénesis de la EP.

DJ-1 tiene la capacidad de responder a los cambios en el microambiente celular redistribuyéndose. En condiciones fisiológicas normales esta proteína se encuentra presente mayormente en el citosol y en menor frecuencia en el núcleo y mitocondrias tanto en la membrana externa, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (Zhang et al., 2005). La presencia de estrés oxidativo conduce a la oxidación del residuo de cisteína (Cys106) lo que provoca, por un lado, que active su función de captador de ROS y sensor de homeostasis redox celular; y, por otro lado, su traslocación desde el citosol hacia las mitocondrias y el núcleo (Kim et al., 2012). La presencia de DJ-1 en el núcleo evita que se active la vía de señalización apoptótica secuestrando la proteína de muerte Daxx (Dolgacheva et al., 2019), y también aumenta la expresión del factor NF- κ B el cual regula transcripcionalmente a la proteína UPC4. La activación de esta última genera un ligero desacoplamiento de la membrana mitocondrial lo que provoca una disminución de la fuerza motriz de protones y la cantidad de acarreadores de electrones oxidativos como la NADH y la Coenzima Q (Dolgacheva et al., 2019) reduciendo así el estrés oxidativo. Esto resulta crucial para mantener la función y homeostasis mitocondrial.

Por su parte, las proteínas DJ-1 localizadas en las mitocondrias se activan para cumplir su función de citoprotección contra ROS, interaccionando con el complejo I de la cadena transportadora de electrones manteniendo su función y con una red de enzimas que actúan en defensa antioxidante como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa y paraoxonasa (Parsanejad et al., 2014)

Parkinson y corazón

La cardiomiopatía isquémica (CI) es la causa principal de muerte en todo el mundo (Khan et al., 2020). Las manifestaciones clínicas de la CI son consecuencia de los efectos perjudiciales de la lesión aguda por isquemia/reperfusión (IRI, por sus siglas en inglés *ischemia reperfusion injury*) en el miocardio. La IRI se produce cuando se presenta una ausencia de flujo sanguíneo (isquemia) lo que causa un desequilibrio entre la demanda y aporte de oxígeno requerido para un buen funcionamiento corporal. Particularmente en el músculo cardíaco, si el restablecimiento del aporte sanguíneo (reperfusión) se da dentro de los primeros 15 minutos, las alteraciones serán reversibles, es decir, no habrá muerte celular miocárdica. Si la isquemia se extiende en el tiempo, las alteraciones serán irreversibles, presentando interrupciones de la membrana plasmática, inflamación celular, agregación periférica de la cromatina nuclear y alteraciones mitocondriales, afectando la estructura del miocito (Yellon y Hausenloy, 2007).

El corazón, al igual que las neuronas, presenta una alta demanda de energía y limitada capacidad de regeneración, siendo particularmente sensible al estrés oxidativo. Tras la exposición a ROS, el corazón experimenta un crecimiento hipertrófico, un proceso que implica agrandamiento celular, desorden miofibrilar y reexpresión de genes fetales (Sadoshima y Izumo., 1997). Aunque la hipertrofia cardíaca se considera una respuesta adaptativa inicial, la hipertrofia prolongada es, en última instancia, perjudicial y conduce a una insuficiencia cardíaca progresiva (Billia et al., 2013). Ya que el estrés oxidativo presente en el corazón contribuye al desarrollo de insuficiencia cardíaca (Billia et al., 2013) y teniendo en cuenta la expresión sistémica del gen *PARK7* y su fuerte implicancia en la regulación de ROS, resulta inevitable preguntarnos cómo mutaciones en este gen podrían afectar a la función cardíaca.

Se ha demostrado que pacientes que presentan EP tienen un mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares tales como cardiomiopatía, enfermedad de arteria coronaria, arritmias, insuficiencia cardíaca y muerte súbita, siendo la insuficiencia cardíaca (IC) la principal causa de muerte prematura en pacientes con EP familiar (Piqueras-Flores et al., 2018).

Se ha descrito que DJ-1 tiene importantes funciones en el corazón, regulando el estrés oxidativo en el mismo, siendo un antioxidante único y esencial que funciona independientemente de otras vías antioxidantes en respuesta a ROS, lo cual resulta clave en el desarrollo de la insuficiencia cardíaca (Billia et al., 2013). No sólo se encuentra involucrada en la citoprotección miocárdica frente a estrés oxidativo, sino también cuando hay presencia de estrés glicativo, ya que se demostró que DJ-1 actúa protegiendo al corazón contra el desarrollo de IRI en estas condiciones (Shimizu et al., 2016). Además, esta proteína, participa en la regulación de la hipertrofia cardíaca mediante la inhibición de la autofagia a través de la vía de señalización mTOR. La autofagia es un proceso biológico de reciclado esencial para mantener la homeostasis celular bajo estrés (Lum et al., 2005). En cuanto a la hipertrofia cardíaca, la evidencia sugiere que los niveles basales de autofagia ayudan a mantener la morfología y función cardíacas (Nakai et al., 2007).

Sumado a esto, se demostró que DJ-1 se expresa de manera uniforme en el cardiomiocito adulto de rata, localizándose en el citosol y en el núcleo. Luego de sufrir un daño oxidativo por IRI se la puede encontrar también en las mitocondrias (Shimizu et al., 2016). La activación de DJ-1 regula la SUMOilación de la proteína relacionada con la dinamina 1 (Drp1) (Shimizu et al., 2016), una modificación postraduccional en la cual se adiciona una pequeña proteína denominada SUMO generando un cambio de función proteica. Drp1 en su estado SUMOilado se localiza a nivel mitocondrial induciendo la fisión. La interacción de DJ-1 con la deSUMOilasa SENP5 conduce a la deSUMOilación de Drp1 impidiendo la localización mitocondrial de Drp1, protegiendo de esta manera al corazón de la fisión mitocondrial y evitando así una mayor producción de ROS. Por lo tanto, DJ-1 sería un regulador negativo de Drp1 y la fisión mitocondrial en el corazón (Shimizu et al., 2016).

Si la función primaria de DJ-1 es inhibir la acción de ROS, su inactivación debería dar como resultado una mayor producción de este, mayor daño oxidativo y deterioro del rendimiento cardíaco. Por su implicancia en la función cardíaca es que se ha propuesto a DJ-1 como un posible blanco terapéutico importante para la cardioprotección (Chen et al., 2019). Por lo tanto, resulta importante estudiar los efectos cardíacos de las mutaciones genéticas que generan la EP.

Las múltiples funciones de DJ-1 se resumen en la Figura 3.

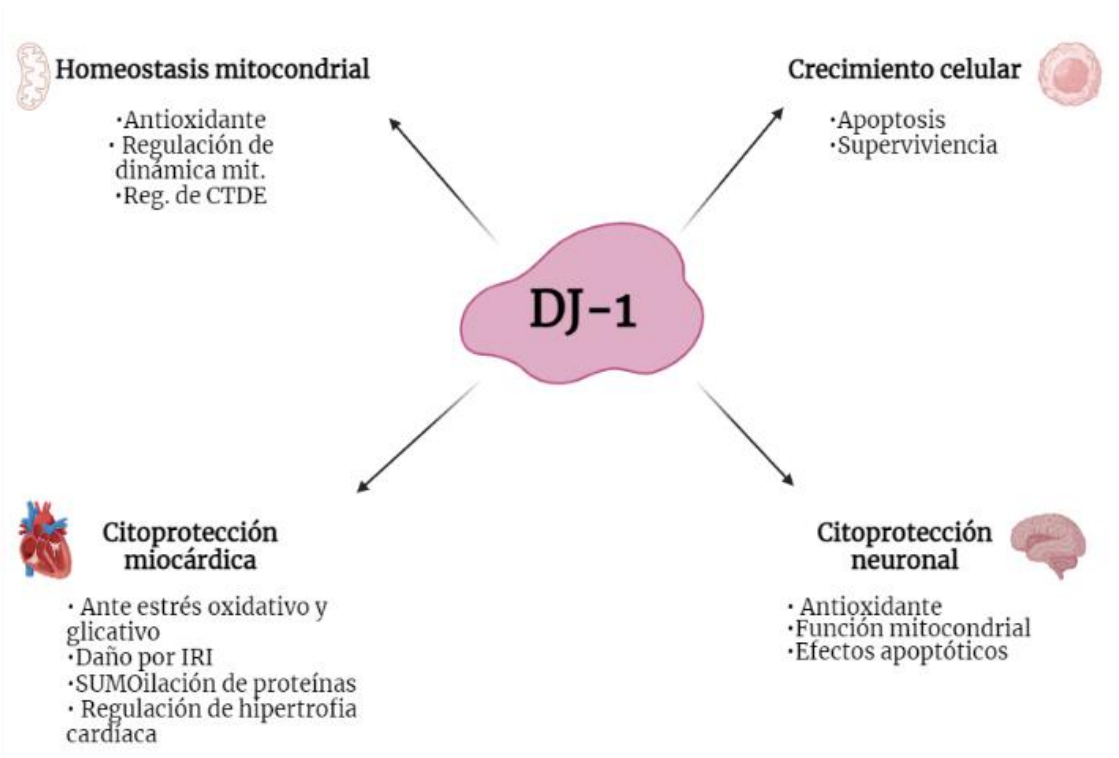


Figura 3: Funciones de DJ-1 en la mitocondria, la célula, el corazón y las neuronas.

Terapias actuales para EP

Para este trastorno neurodegenerativo no existen tratamientos que detengan la enfermedad, pero sí fármacos con la capacidad de controlar los síntomas motores, los cuales se enfocan en restaurar el nivel dopaminérgico en el cuerpo estriado. Dentro de los tratamientos más conocidos se encuentran: **Levodopa**, precursor de la dopamina, que incrementa los niveles de este neurotransmisor en el músculo estriado (Connolly et al., 2014); **agonistas dopaminérgicos**, son útiles como terapia de inicio temprano de EP leve-moderada simulando la acción de la dopamina en los receptores postsinápticos; **los inhibidores de la monoamino oxidasa B (MAO-B)**, estos fármacos inhiben la degradación de la dopamina aumentando así la vida media de la dopamina en la sinapsis. Son eficientes en EP con síntomas leves y retrasa la necesidad de levodopa (Zahoor y Shafi, 2018).

Estos tratamientos resultan efectivos mejorando la función motora, sin embargo, el consumo crónico de los mismos generan efectos secundarios, como por ejemplo,

discinesia, náuseas, psicosis, trastornos del control de impulsos y problemas cardíacos (Connolly et al., 2014). Teniendo en cuenta lo anterior y la gran importancia que el estrés oxidativo posee en la fisiopatología de EP resulta necesario explorar nuevas alternativas terapéuticas no dopaminérgicas, que involucren sustancias antioxidantes.

Cannabis como posible terapia

Cannabis sativa es una de las plantas cultivadas más antiguas del mundo (Bridgeman y Abazia, 2017). Aunque los primeros registros escritos del uso humano del cannabis datan del siglo VI a.C., la evidencia existente sugiere que su uso en Europa y Asia oriental comenzó a principios del Holoceno (Bridgeman y Abazia, 2017). Esta planta produce más de 60 compuestos fitocannabinoides terpenofenólicos en sus tricomas que están presentes en hojas y flores (Schrot y Hubbard, 2016). Los principales cannabinoides presentes en ella son el cannabidiol (CBD) y el tetrahidrocannabinol (THC). Mientras que el THC tiene efectos psicoactivos a través de la interacción con los receptores CB1 y CB2 en los individuos que lo consumen, el CBD se caracteriza por tener propiedades antioxidantes y antiinflamatorias siendo reconocido por los receptores de potencial transitorio V1 (TRPV1) (Bisogno et al., 2001) y presentando baja afinidad por CB1 y CB2 (Thomas et al., 2007). Por sus características farmacológicas es que el CBD se ha estudiado como alternativa terapéutica en enfermedades que se encuentran relacionadas al estrés oxidativo e inflamación (Peres et al., 2018).

En humanos se sintetizan cannabinoides naturales, llamados endocannabinoides, los cuales son moléculas involucradas en las vías de señalización del sistema endocannabinoide (Elphick y Egertová, 2001). Este sistema se encarga de regular procesos fisiológicos como la liberación de neurotransmisores, percepción del dolor, funciones cardiovasculares, gastrointestinales y hepáticas. También se ha evidenciado que se encuentra involucrado en el control de movimientos motores ya que hay una marcada presencia de receptores CB1, CB2 y TRPV1 junto con endocannabinoides en los ganglios basales y el cerebelo siendo estas las áreas que controlan el movimiento (Fernández- Ruiz et al., 2013).

En relación con la EP, se demostró que los pacientes que eligen el CBD de manera alternativa como tratamiento muestran una disminución en los síntomas psiquiátricos (Zuardi et al., 2009) y mejor calidad de vida (Chagas et al., 2014). A su vez, investigaciones en animales evidenciaron que los cannabinoides ofrecen propiedades neuroprotectoras suprimiendo daños oxidativos que tienen como consecuencia la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (García-Arencia, 2007) y de cardioprotección. Esto último se demostró en cardiomiocitos humanos donde este fitocannabinoide tiene una función protectora atenuando la disfunción miocárdica, el estrés oxidativo/nitritivo, la inflamación y la muerte celular (Rajesh et al., 2010). Es posible que este efecto cardioprotector del CBD se atribuya a su poder antiinflamatorio gracias a su interacción con los receptores TRPV1, CB2 y GPR55 (Pellati et al., 2018). Además, se ha demostrado que el CBD posee efectos positivos frente al daño por isquemia miocárdica, logrando reducir el tamaño del infarto y protegiendo al corazón de

las arritmias (Durst et al., 2007). Se evidenció que en presencia de este cannabinoide, tanto la expresión como la actividad enzimática de SOD aumentan, disminuyendo los niveles de ROS, cumpliendo sus efectos antioxidantes (Atalay et al., 2019). Por otro lado, en un modelo celular de leucemia linfoblástica aguda (ALL), se ha demostrado que uno de los blancos celulares del CBD podría ser la mitocondria. Dada su alta lipoafinidad el CBD es capaz de atravesar la membrana plasmática y actuar directamente sobre la mitocondria. En particular, en las células ALL el CBD parecería interaccionar con la proteína mitocondrial VDAC (*voltage-dependent anion channel*) cambiando su capacidad para manejar el Ca^{2+} (Olivas-Aguirre et al., 2019). Sin embargo, los ensayos clínicos realizados hasta el momento incluyen pocos pacientes y es necesario continuar con los estudios tanto clínicos como preclínicos antes de concluir acerca de la efectividad del tratamiento.

Teniendo en cuenta esto y que el CBD presenta efectos antioxidantes, su posible acción sobre las mitocondrias y que es una terapia alternativa ampliamente utilizada por los pacientes con EP, resulta importante estudiar los efectos del CBD a nivel cardíaco en un modelo de EP.

***D. melanogaster* como organismo modelo**

Para esto es necesario utilizar organismos que lo permitan. En este contexto, estudios anteriores del grupo de trabajo han demostrado que el consumo de cannabis genera un impacto en el sistema cardíaco utilizando la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* como modelo de estudio (Gómez et al., 2019). En este trabajo se observó que el consumo crónico de una variedad alta en THC de la planta natural de cannabis incrementa el índice de arritmias en etapas tempranas y que en etapas posteriores se genera un aumento en la contractilidad cardíaca asociado con una desaparición de la arritmia inicial. Por lo tanto, este insecto puede ser utilizado como modelo para estudiar los efectos del cannabis y, en particular, el impacto sobre el sistema cardíaco ya que la mosca de la fruta presenta similitudes tanto a nivel genético como fisiológicos con el corazón humano (Santalla et al., 2016). Uno de los aportes más interesantes de la mosca de la fruta es que permite explorar los efectos producidos por el consumo de cannabis a través de la vía inhalatoria, lo que representa actualmente una ventaja sobre los modelos de mamíferos.

En cuanto a DJ-1, *Drosophila* presenta dos isoformas de la proteína, DJ-1 α y DJ-1 β , las cuales comparten una identidad similar con DJ-1 humana. Los residuos clave en esta proteína se conservan en ambas isoformas presentes en las moscas, incluida la cisteína 106, la cual se modifica en presencia de estrés oxidativo (Kim et al., 2012). Se ha demostrado que ninguno de estos ortólogos está significativamente más relacionado con la proteína humana, lo que difiere entre ellos en la mosca es su expresión diferencial (Meulener et al., 2005). Mientras que DJ-1 α se expresa predominantemente en testículos y menormente en cerebro, DJ-1 β se expresa de manera ubicua en la mayoría de los tejidos asemejándose al patrón de expresión de DJ-1 en humanos (Meulener et al., 2005). Varios grupos de investigación caracterizaron moscas mutantes

double knock out (DKO) para DJ-1 α y DJ-1 β y encontraron que estas presentaban un estado físico reducido, vida media más corta, problemas de fertilidad y defectos en la función mitocondrial (Hao et al., 2010). En cuanto al control respiratorio, se vio disminuido en moscas DKO ya que las mismas presentaron un menor consumo de oxígeno y menor producción de ATP. Sin embargo, estos individuos eran capaces de mantener el potencial de membrana mitocondrial en ausencia de DJ-1 (Hao et al., 2010). Se evidenció también que moscas adultas mutantes solo para la isoforma DJ-1 β no mostraron disminución significativa de neuronas dopaminérgicas en comparación con las moscas control, ni formación de cuerpos de Lewy. Pero esta mutación generó una sensibilidad al estrés oxidativo en estas neuronas presentando una disfunción mitocondrial de las mismas (Hao et al., 2010).

Por todo lo mencionado y dada la existencia de moscas mutantes que presentan deleciones en los genes codificantes para DJ-1, es que este organismo puede ser utilizado como modelo para estudiar los efectos del parkinsonismo familiar y evaluar el uso del cannabis como posible tratamiento.

Ya que se encuentra descripto que DJ-1 es una proteína implicada en la regulación de la función tanto cardíaca como neuronal, y que el CBD es un compuesto que presenta propiedades antioxidantes que pueden aprovecharse como posible tratamiento nuestra **hipótesis** de trabajo es que *la deleción sistémica de la isoforma β del gen DJ-1, causante de la EP, produce efectos motores y cardíacos que pueden ser modificados tras el tratamiento con una cepa de cannabis alta en CBD.* El **objetivo general** de este trabajo fue *caracterizar el fenotipo de EP familiar a nivel motor y de la función cardíaca en moscas que presentan deleciones en la isoforma β del gen DJ-1 y evaluar el tratamiento con cannabis sobre los efectos de esta mutación.* Como objetivos específicos nos propusimos: evaluar el comportamiento de las moscas modelo de EP en cuanto a su capacidad de escalado antes y después del tratamiento crónico con una cepa de cannabis alta en CBD; comprobar la expresión de DJ-1 en tejido cardíaco de *D. melanogaster*; caracterizar el estado mitocondrial en mitocondrias aisladas de moscas modelo de EP y, estudiar la función cardíaca de moscas modelo de EP antes y después del tratamiento con una cepa de cannabis alta en CBD.

Materiales y métodos

Mantenimiento y amplificación de *stocks*

Para cumplir los objetivos planteados en este trabajo se utilizaron dos líneas de moscas *D. melanogaster*:

1. La línea *wild type* w^{1118} . Estas moscas cumplieron la función de control (*ctrl*) y
2. La línea w^{1118} ; DJ-1 $\beta^{\Delta 93}$ (*park*). Estas moscas presentan una deleción en el gen DJ-1 β que les confiere un fenotipo de enfermedad de Parkinson.

Ambas líneas provenientes del *Bloomington Drosophila Stock Center* (número de *stock* BDSC_3605 y BDSC_33601, respectivamente) se amplificaron y mantuvieron a temperatura ambiente en viales suplementados con harina de maíz, glucosa, levadura, agar y antimicótico para evitar contaminación (por cada 300 ml de agua: 25 gr de h de maíz, 22gr de glucosa, 4,4 gr de levadura, 2,65 gr de agar y 7,7 ml de antimicótico al 10% p/v en etanol). Se realizaron recambios cada 3 días para mantener la limpieza de los viales.

Como se mencionó anteriormente, la EP es una enfermedad progresiva que se incrementa con el tiempo por este motivo, se llevó a cabo una sincronización de individuos para obtener así poblaciones de moscas con la misma edad. Los experimentos se realizaron utilizando moscas jóvenes de 7 días de edad y moscas adultas de 40 días de edad de ambas líneas. De esta manera se compararon individuos con y sin sintomatología parkinsoniana.

Además, las moscas adultas fueron sometidas al tratamiento con dos dosis diarias de vapor de cannabis .

Tratamiento con cannabis

La EP es un padecimiento crónico y sin cura, es decir, se trata de una enfermedad de larga duración que no mejora con el tiempo. El cannabis ha sido en el último tiempo una terapia alternativa ampliamente utilizada por los pacientes con EP. Por este motivo, en este trabajo se utilizó como tratamiento un híbrido de *Cannabis sativa* L. denominado “Juanita” con una composición química 1:1 de THC:CBD. El material vegetal fue donado por la asociación civil PlantAr Ciencia. El suministro del mismo comenzó a partir del día 25 de edad, momento en el cual las moscas mutantes mostraron un fenotipo de parkinsonismo acentuado (Figura 4) Se utilizó un dispositivo de vaporizado de diseño propio (Figura 5). El mismo cuenta con un vaporizador Ascent de DaVinici™ conectado a un sistema de mangueras que permitió la circulación de vapor hacia un vial vacío donde, previamente, fueron transferidas las moscas a tratar. Se cortaron y picaron 0,03 gr de cannabis seco y se los colocó en el vaporizador el cual aumentó bruscamente la temperatura a unos 170°C, logrando de este modo la vaporización de los cannabinoides presentes en el material vegetal. El vapor se recogió con una jeringa y se administraron 40 ml del mismo a temperatura ambiente a los individuos. Estos permanecieron en contacto con las sustancias vaporizadas durante 15 minutos. Este tratamiento se llevó a cabo dos veces al día, todos los días, con un

mínimo de dos horas de diferencia entre dosis del material vegetal vaporizado. Se cumplió así un tratamiento crónico a partir de la aparición de la sintomatología parkinsoniana.



Figura 4. Línea temporal donde se indica el inicio del tratamiento con cannabis luego de la aparición del fenotipo parkinsoniano característico.

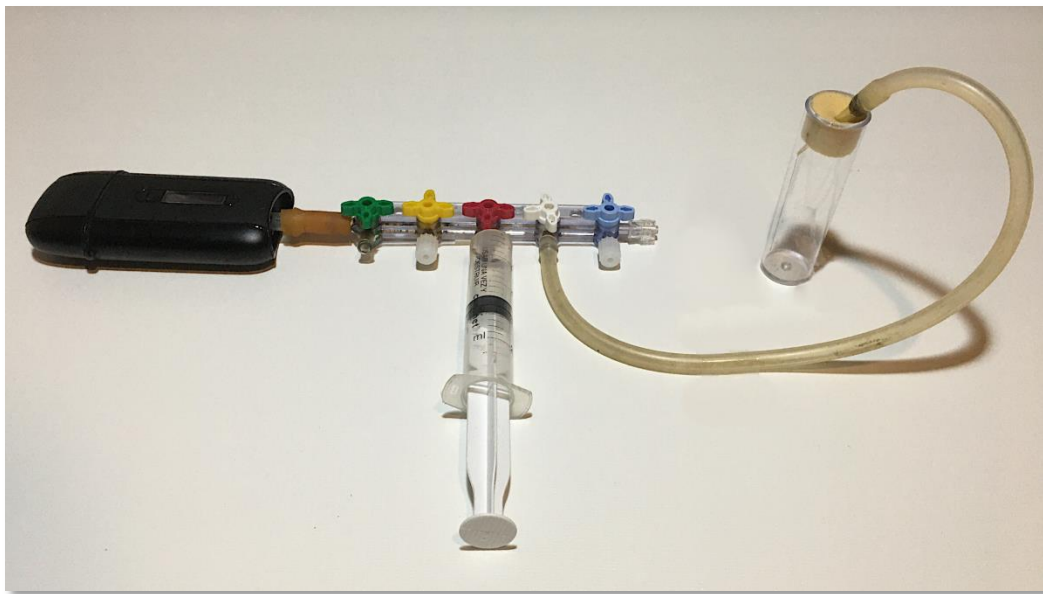


Figura 5. Vaporizador para suministrarles a las moscas el tratamiento con el material vegetal vaporizado por vía inhalatoria. De izquierda a derecha: vaporizador conectado al dispositivo que permite consumir compuestos por vía inhalatoria comunicado a través del sistema de mangueras con un vial sellado con un tapón de gomaespuma que contiene a las moscas.

Caracterización fenotípica

- **Comportamiento**

Ya que la EP afecta al comportamiento del individuo que la padece es necesario e importante evaluar cómo se da el desarrollo de los síntomas en esta enfermedad. Las moscas mutantes elegidas para realizar este trabajo logran reproducir la sintomatología parkinsoniana presentando un fenotipo con disminución en la capacidad de escalado y bradisinecia, es decir, una disminución en la velocidad de los movimientos (Hao et al., 2010).

Con el fin de evaluar el comportamiento y el desarrollo de síntomas motores se analizaron grupos de entre 15 y 20 moscas, las cuales fueron transferidas a viales vacíos que contenían dibujada una línea vertical de 6 centímetros. Estos fueron golpeados suavemente tres veces de modo tal que las moscas se acumularon en el fondo del mismo y se observaron durante 20 segundos para determinar qué porcentaje de las moscas lograron escalar superando la línea. Este experimento comenzó a realizarse en el primer día de vida de las moscas y se llevó a cabo todos los días hasta el día 40 de edad. Se comparó la capacidad de escalado de moscas mutantes vs. control antes y después del tratamiento con cannabis.

Para realizar el análisis se registró en videos el comportamiento de los individuos y se calculó el promedio de la cantidad de moscas que son capaces de superar los 6 centímetros, siendo este resultado la habilidad de escalado.

Función cardíaca.

La EP genera comorbilidades cardíacas haciendo que los pacientes presenten mayor riesgo de desarrollar enfermedades arteriales, arritmias, insuficiencia cardíaca y muerte súbita (Piqueras-Flores et al., 2017). Además, ha sido demostrado que DJ-1 cumple un rol protector en el corazón (Shimizu et al., 2016). Para estudiar cómo afecta la delección de DJ-1 en el corazón se realizaron estudios funcionales utilizando individuos de 7 y 40 días de edad de las líneas w^{1118} y DJ-1 $\beta^{\Delta 93}$.

Los individuos fueron anestesiados brevemente utilizando dióxido de carbono (CO_2) y colocados de manera dorsal en una caja de Petri la cual contenía: vaselina para fijar los organismos y hemolinfa artificial oxigenada (en mM, 108 NaCl, 5 KCl, 8 MgCl_2 , 1 NaH_2PO_4 , 4 NaHCO_3 , 5 HEPES, pH 7.1, 10 sacarosa, 5 trehalosa y 2 CaCl_2) para mantener los corazones latiendo. Se realizó un corte con el fin de eliminar la cabeza y parte de la región ventral de modo tal que se eliminó la influencia neuronal en la actividad cardíaca. Luego, se abrió la zona abdominal para poder retirar los órganos y cuerpos grasos logrando así dejar el corazón expuesto adherido a la pared dorsal.

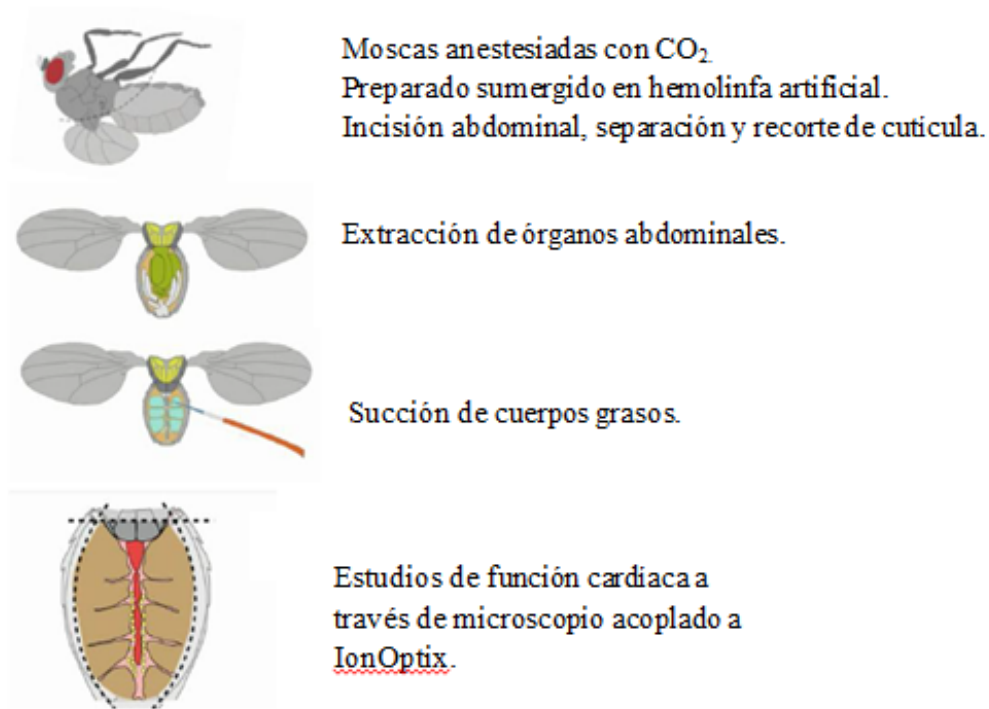


Figura 6. Preparado semi-intacto de corazón de *Drosophila melanogaster*: La mosca se posiciona sobre el dorso para realizar su disección. Modificado de Vloger y Ocorr, 2009.

Una vez logrado el preparado, se llevó a un microscopio acoplado a IonOptix para poder evaluar el estado de la función cardíaca. Se registró la actividad cardíaca durante 60 segundos. Los registros obtenidos fueron procesados en el programa LabChart 7 (ADInstruments). Se evaluaron los siguientes parámetros cardíacos: frecuencia cardíaca, acortamiento de la pared del corazón, máximas velocidades de contracción y relajación (derivadas negativa y positiva, respectivamente), variabilidad de la frecuencia cardíaca (índice de arritmias), intervalo diastólico y la constante de relajación (Tau).

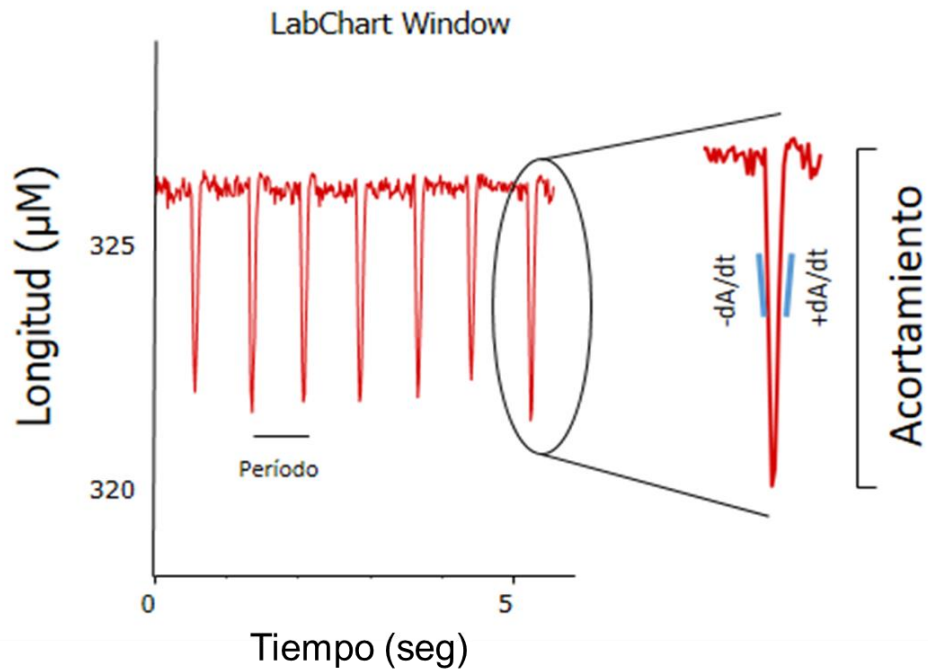


Figura 7: Registro típico de longitud de acortamiento de la pared del corazón. Los parámetros medidos fueron: periodo cardíaco (tiempo entre latidos); acortamiento (la diferencia entre los eventos máximos y mínimos en la contracción cardíaca) y las derivadas negativas y positivas representan las velocidades máximas de contracción y relajación respectivamente.

Estado mitocondrial

Se ha evidenciado que en la EP las mitocondrias se encuentran fuertemente alteradas en cuanto a su buen funcionamiento, lo que afecta a sus tareas principales como la producción de energía y la regulación del estrés oxidativo (Guzmán et al., 2010; Calí et al., 2013). Teniendo en cuenta esto y que DJ-1 es una proteína que afecta a estas organelas, fue de nuestro interés conocer el estado mitocondrial ante la presencia de la delección de la isoforma β del gen DJ-1.

- **Aislamiento mitocondrial**

Para realizar los ensayos en mitocondrias aisladas se utilizaron entre 0,05 y 0,08 gr de moscas tanto *ctrl* como *park*. Se comenzó por anestésiar a las mismas someténdolas a 4°C durante 3 minutos, una vez logrado esto se llevó a cabo la homogenización de los individuos. Para esto se colocaron 2ml de Buffer A (solución que contenía: manitol 210 mM, sacarosa 70 mM, EDTA 1 mM y Tris HCl 50 mM ajustada a un pH 7,4) en un tubo de ensayo junto con las moscas anestésiadas. Se procedió a homogenizar en hielo para mantener el frío y así la integridad de las mitocondrias. Se utilizó un homogenizador manual, haciendo fuerza hacia el fondo del tubo unas 30 veces, sin girar ni dejar que entre aire al preparado para no dañar las mitocondrias.

Luego se llevó a cabo una serie de 4 centrifugaciones diferenciales para poder limpiar el preparado y quedarnos con las mitocondrias aisladas.

Primera centrifugación: se centrifugó la muestra homogenizada a 2600 xg durante 6 minutos. Este paso fue de suma importancia para descartar núcleos, membranas y exoesqueleto, lo cual quedó en el pellet del eppendorf luego de la centrifugación. Por este motivo rescatamos el sobrenadante.

Segunda centrifugación: se centrifugó el sobrenadante rescatado a 12000 xg durante 10 minutos. En este caso, nos quedamos con el pellet donde se encontraban las mitocondrias. El mismo fue resuspendido en 1 ml de buffer B (solución de igual composición que la solución A pero con 0,1 mM de EDTA). Luego se realizaron dos lavados.

Tercera centrifugación (primer lavado): se centrifugó la resuspensión a 12000 xg durante 5 minutos. Rescatamos el pellet el cual fue resuspendido en 1 ml de buffer B.

Cuarta centrifugación (segundo lavado): se centrifugó la resuspensión realizada nuevamente a 12000 xg durante 5 minutos. El pellet formado se resuspendió en 500 μ L de buffer B, donde se encontraron finalmente las mitocondrias de *D. melanogaster* aisladas.

- **Evaluación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_{mit}$):**

Para llevar a cabo este paso se utilizó el indicador catiónico fluorescente Rodamina-123 (cloruro de 3,6-diamino-9-(2-(metoxi-carbonil) fenil) xantina) (R-123). Debido a que la R-123 posee carga positiva y la matriz mitocondrial negativa el indicador tenderá a ingresar a este compartimento disminuyendo la fluorescencia del medio. La determinación comenzó con la lectura de la fluorescencia de R-123 en el medio (F1). Posteriormente se agregaron 0,04 mg de mitocondrias aisladas. Por último, se realizó una centrifugación a 15.000 xg durante 3 minutos lo que generó una caída de las mitocondrias al pellet y se leyó la fluorescencia del sobrenadante (F2).

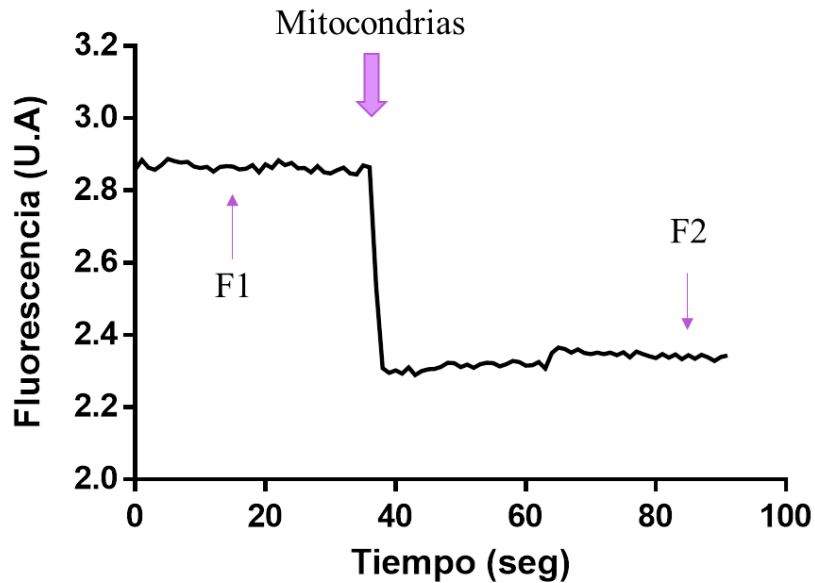


Figura 8: Trazo típico de una determinación de potencial de membrana mitocondrial con la técnica de R-123.

La combinación de glutamato/malato se utiliza como sustratos mitocondriales, ya que la presencia de estos compuestos estimula el proceso de respiración oxidativa a través del complejo I de la cadena transportadora de electrones. Por su parte, el succinato también es considerado un estimulante de la respiración mitocondrial pero la diferencia radica en que esta sustancia estimula el complejo II de la cadena transportadora de electrones.

Por el contrario, se conoce a la rotenona como una sustancia tóxica ya que su acción radica en la inhibición del complejo I de la cadena transportadora de electrones bloqueando así la respiración celular.

Por lo mencionado anteriormente, se compararon tres medios de reacción (F1) preparados en una cubeta de un 1 ml. Estos tenían en común el buffer C (Solución que contenía Mops-Tris 10 mM, Sacarosa 250 mM, Pi-Tris 5 mM, EGTA 10 mM y R-123 0,4 mM) y diferían en:

1. La primer contenía 5mM/2,5mM glutamato/malato-Tris. Para estimular el complejo I
2. La primera contenía 5 mM de succinato y 0,75 μ M de rotenona. Para estimular el complejo II mientras se inhibe el complejo I
3. La segunda contenía 5 mM de succinato. Para estimular el complejo II

A partir de una curva de calibración de proteínas utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976) y del valor de fluorescencia del medio, F1, se calculó la [R-123] total (nmol/l). Luego, la cantidad de nmoles de R-123 totales en el volumen de reacción se calculó con la siguiente ecuación:

$$nmoles R - 123 \text{ totales} = \frac{Vol. Cubeta (1ml) \times [R - 123]_{total} \left(\frac{nmol}{L}\right)}{1000ml/l}$$

A partir de la curva de calibración y del valor de fluorescencia del sobrenadante F2 se calculó la [R-123] en el medio (nmol/l). Luego, la cantidad de nmoles de R-123 medio en el volumen de reacción se calculó con la siguiente ecuación:

$$nmoles R - 123 \text{ medio} = \frac{Vol. Cubeta (1ml) \times [R - 123]_{medio} \left(\frac{nmol}{L}\right)}{1000ml/l}$$

En un paso posterior se calculó la cantidad de nmoles de R-123 internalizados en la mitocondria:

$$nmoles R - 123 \text{ mito} = nmoles de R - 123 \text{ total} - nmoles de R123 \text{ medio}$$

La concentración de R-123mito expresada en nmol/mg proteína se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$[R - 123] = \frac{1 \text{ mg} \times nmoles R - 123 \text{ (mito)} \times 1ml}{Vol \text{ muestra} \times [proteinas]mg/ml}$$

Dado que la distribución de R-123 depende del grado de partición de la misma en las membranas lipídicas, la concentración de R-123 libre en la matriz [R-123]matriz (nmol/μl) se calculó corrigiendo por el coeficiente de permeabilidad de la R-213 en las membranas lipídicas (siendo $K_i = 26 \mu l/mg$ y $K_o = 120 \mu l/mg$ los coeficientes de la membrana interna y externa respectivamente):

$$[R - 123]_{mito} = K_i [R - 123]_{matriz} + K_o [R - 123]_{medio}$$

Finamente, el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) se calculó con la ecuación de Nernst-Guggenheim, expresando los valores en mV.

$$\Delta\psi_m = 59 \log \log \frac{[R - 123]_{matriz}}{[R - 123]_{medio}}$$

Una vez obtenidos los potenciales de membrana mitocondrial en los grupos experimentales se comparó el efecto de la delección de DJ-1 sobre el estado mitocondrial.

RT- PCR de DJ-1

D. melanogaster presenta dos homólogos de DJ-1: DJ-1 α y DJ-1 β , presentando expresión diferencial entre ellos. Se ha demostrado que DJ-1 α se encuentra predominantemente en los testículos, mientras que DJ-1 β presenta una expresión ubicua en la mayoría de los tejidos (Meulener et al., 2005) asemejándose al patrón de expresión de DJ-1 en humanos. Artículos anteriores, como el de Min y colaboradores, demostraron que mutantes de *Drosophila* para DJ-1 β expresan una regulación compensatoria positiva de DJ-1 α en el cerebro pero no en mosca completa (Menzies et al., 2005).

Para corroborar la expresión de la isoforma DJ-1 β en el tejido cardíaco de moscas *wild type* y su delección en moscas *park* se llevó a cabo una retrotranscripción del ARNm con posterior amplificación del ADNc (RT-PCR) de corazones. Como órgano control se utilizaron cerebros de ambas líneas. A su vez, se evaluó la expresión de DJ-1 α en ambos tejidos. Como control de PCR se utilizó el gen de la tubulina.

- **Diseño de primers:**

El diseño de los *primers* se realizó en la plataforma NCBI Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Se utilizaron las secuencias de ARNm de DJ-1 α y β (NM_137072.1 y NM_143568.3, respectivamente).

La tabla 1 muestra los pares de *primers* seleccionados para ser evaluados experimentalmente. Los *primers* para el ARNm de la tubulina estaban en uso en el laboratorio y sus secuencias son:

Tub Fw: 5'ATCAACTACCAGCCTCCAC 3'

Tub Rev: 5' TCCTCCATCCCCTCCCCSAC 3'.

Nombre del primer	Gen	Secuencia (5'->3')	Tm	GC %	Tamaño del producto ARNm	Tamaño del producto ADN
Dm DJ-1 alpha Fw2	DJ-1 alpha	GCGTTGATGAACTCGTCT GC	59.91	55	234	290
Dm DJ-1 alpha Rv2	DJ-1 alpha	GCCAGGACCACGACTTG TAA	59.97	55		
Dm DJ-1 beta Fw3	DJ-1 beta	GGCATCAAGGTCACCGT AGC	61.09	60	474	540
Dm DJ-1 beta Rv3	DJ-1 beta	GTAGGCCACAAGAAGAC CCT	59.02	55		

Tabla 1. Primers para RT-PCR de DJ-1 α y DJ-1 β . Información acerca de temperatura de *melting*, porcentaje de guanina/citocina, tamaño del producto de amplificación usando ARNm como molde y tamaño del producto de amplificación utilizando ADN como molde de los pares de *primers* seleccionados.

- **Extracción de ARN:**

Para evaluar la expresión del gen *DJ-1* en el corazón de *D. melanogaster*, se aislaron 150 corazones que se mantuvieron en 150 μL de *RNAlater* hasta ser utilizados. Se extrajo el ARN por el método de *TRIzol*[®] *Reagent* (Life Technologies) según indicaciones del fabricante. Se utilizaron 40 cerebros como control positivo.

Se comenzó con una centrifugación de 1 minuto a 13000 RPM y lograr así que los corazones bajen formando el pellet. Se descartó el *RNAlater* y se agregaron 500 μL de *TRIzol*[®] *Reagent* en cada muestra y se procedió a homogenizar manualmente. Luego se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se agregaron 100 μL de cloroformo. Se dejó durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se llevó a centrifugar a 12000 $\times g$ durante 15 minutos a 4°C.

En este momento se observó una separación de tres fases: la fase superior acuosa donde se encontraba el ARN, la segunda fase donde se encontraba el ADN y por último una fase orgánica donde se encontraban proteínas y lípidos (Figura 9). Fue de nuestro interés rescatar la fase acuosa donde se encontraba el ARN para poder asegurarnos de medir la expresión del gen, por lo tanto, se separó esta fase con cuidado de no contaminarla con ninguna de las otras 2 mencionadas y se transfirió a un tubo *ependorf* limpio. Se agregaron 2 μL de glucógeno y se agregaron 250 μL de isopropanol para generar la precipitación del ARN. Se lo incubó a -20°C durante 10 minutos. Luego se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 1200 $\times g$ a 4°C y se descartó el sobrenadante.

Se procedió a lavar el ARN precipitado con 500 μL de etanol 75% en H_2O DEPC. Por último, se centrifugó durante 5 minutos a 7500 $\times g$ a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar el preparado durante 10 minutos y se resuspendió el pellet de ARN en 30 μL de H_2O DEPC. Se incubó en bloque térmico a 57°C durante 13 minutos.

Para corroborar que la extracción de ARN fue exitosa se midió la absorbancia a 260 y 280 nm de la muestra en NanoDrop[™] 2000/2000c (Thermo Scientific[™]).

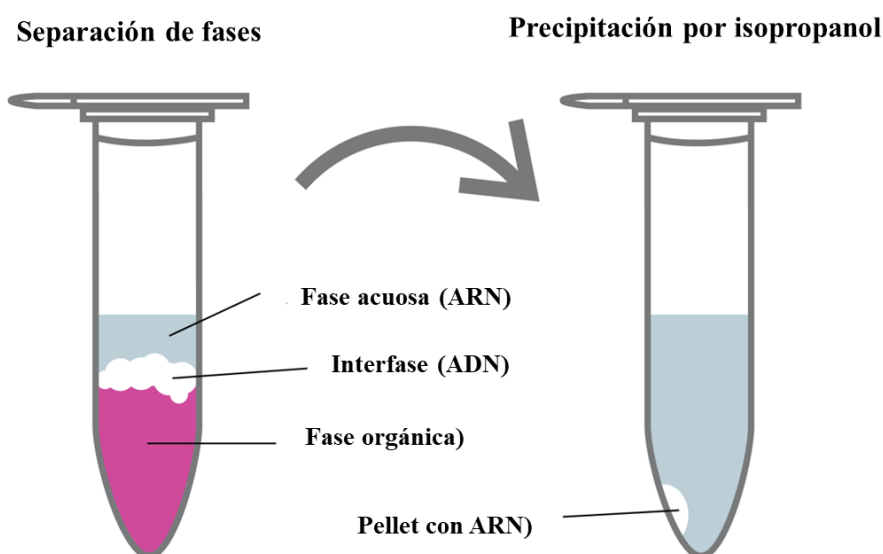


Figura 9. Representación gráfica de la separación de fases luego de la utilización de *TRIzol*[®] *Reagen*.

RT-PCR

La RT-PCR se llevó a cabo utilizando el kit One Step RT-PCR (QiaGen). Este kit posee tanto una enzima retrotranscriptasa como una ADN polimerasa permitiendo la síntesis de ADNc y su posterior amplificación en un mismo paso.

Para realizar este experimento se prepararon 13 tubos de reacción individuales, 12 contuvieron muestra molde y en uno de ellos sin molde que funcionó como control negativo del experimento. Se trabajó siempre en hielo para preservar las muestras y las enzimas. La mix de reacción se llevó a cabo según indicaciones del fabricante utilizando como molde muestras de ARN tanto de corazón como cerebro. En la siguiente tabla se muestra la composición de cada tubo:

Molde	Gen		
	DJ-1 α 1	DJ-1 β 1	Tubulina
Corazón W ¹¹¹⁸	a	b	c
Cerebro W ¹¹¹⁸	d	e	f
Corazón DJ-1 Δ 93	g	h	i
Cerebro DJ-1 Δ 93	j	k	l

Las condiciones de amplificación usadas se detallan en la tabla siguiente:

Transcripción inversa	30 min	50°	} x30 ciclos
Generación de doble cadena	15 min	95°	
Desnaturalización	1 min	94°	
Hibridación de primers	1 min	55°C	
Amplificación	1 min	72°	
Extensión	5 min	72°	
Conservación	∞	4 °	

Para la visualización de los resultados se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa 2%. Para esto se utilizaron 2 gramos de agarosa que se disolvieron en 100 ml de Buffer TAE 1X. Se vertió esta solución en la cama electroforética sellada para que no se escape la preparación y se utilizó un peine que nos permitió formar 14 pocillos en el gel. Una vez solidificado se lo cubrió completamente con buffer TAE 1X y se procedió a sembrar las muestras en cada calle y el marcador de peso molecular 100-1500 pb (InBio Highway)

Preparación de las muestras:

- 15 µl de la muestra de PCR.
- 0,2 µl de GelRed™ (BioAmérica).
- 3 µl de buffer de carga 6X
- En el caso del marcador de peso molecular se utilizaron 5 µL del mismo y 0,1 µL de GelRed™

Una vez realizado esto se tapó la cuba electroforética, se conectaron los electrodos a la fuente de alimentación y se corrió a un voltaje constante de 100 mV durante aproximadamente 45 minutos.

Para el revelado se realizó un equipo ChemiDoc MO (BioRad) exponiendo el gel a la luz UV durante 1 segundo lo que nos permitió visualizar las bandas de ADN.

Por último, se realizó una cuantificación de las bandas de ADN a través de la utilización del programa ImageJ con el fin de conocer si había expresión diferencial de los genes DJ-1β y DJ-1α en corazón y cerebro de moscas mutantes y *wild type*.

Análisis estadístico

Para el análisis comparativo de los datos funcionales se utilizó ANOVA de una o dos vías con posterior test de Tukey cuando se compararon 3 o más condiciones y test de Student cuando se compararon dos muestras. En todos los casos se utilizó un intervalo de confianza del 95%, considerando significativos todos los resultados estadísticos con un $p < 0,05$.

Resultados

La delección de la isoforma β de DJ-1 produce un fenotipo parkinsoniano en *Drosophila melanogaster*.

Dado que la enfermedad de Parkinson es un trastorno del sistema motor, el primer paso en este trabajo fue identificar cómo la mutación de la isoforma DJ-1 β afecta a la movilidad de las moscas *park* comparando su habilidad de escalado con la de los individuos *wild type*.

Se evaluó la variación de la habilidad de escalado en el tiempo. Las moscas *park* presentaron una marcada disminución en la habilidad de escalado en el tiempo en comparación con las moscas control. Sorprendentemente, esto comienza a manifestarse de manera significativa a partir de los 10 días de edad, siendo en este momento moscas jóvenes. Se observa un cambio en la pendiente de la curva entre los 15 y 20 días. La disminución de la actividad locomotora se encuentra acentuada a partir del día 25 de edad de los individuos (Figura 10) consistente con el fenotipo de EP.

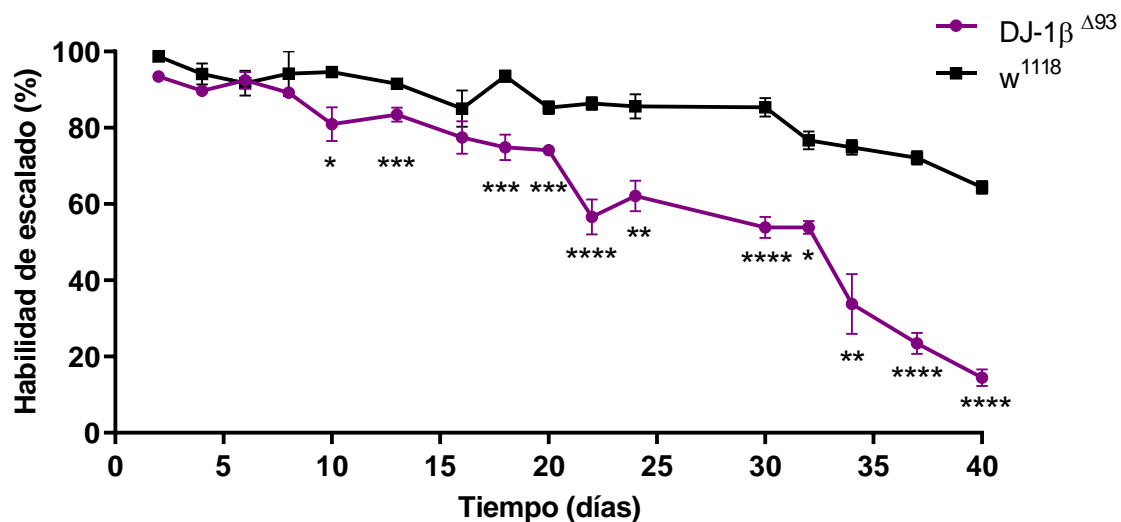


Figura 10. Habilidad de escalado de moscas *park* comparada con la de las moscas control. Se observa una disminución significativa en la habilidad de escalado a partir del día 10 de vida, con un aumento progresivo en la significancia a partir del día 25 de edad.

La delección de la isoforma β de DJ-1 provoca un detrimento en la función cardíaca.

En segundo lugar, nos propusimos explorar cómo la delección en DJ-1 β afecta a la funcionalidad del corazón, ya que, como se mencionó anteriormente, esta proteína se encuentra involucrada en el mantenimiento cardíaco. Teniendo en cuenta también que la EP es un trastorno que se da de manera progresiva en el tiempo, se estudió la función cardíaca de las moscas a dos edades distintas: a los 7 días (moscas jóvenes) y a los 40 días (moscas adultas). Para evaluar el cronotropismo del corazón estudiamos la

frecuencia cardíaca (FC) y el intervalo diastólico (tiempo que transcurre entre el fin de una diástole e inicio de la siguiente sístole). La contractilidad fue evaluada a través del acortamiento de la pared del corazón, las máximas velocidades de contracción y relajación (derivadas negativa y positiva, respectivamente, indicando qué tan rápido el corazón se contrae y se relaja), y la constante de relajación Tau. Se utilizó el índice de arritmias como medida de la variabilidad de la frecuencia cardíaca.

A los 7 días de edad las moscas *park* presentaron una función cardíaca desmejorada en comparación con las moscas control. Estas moscas presentaron una disminución significativa tanto de la frecuencia cardíaca como así también en el acortamiento de una de las paredes del corazón (Figura 11 A y B). Sumado a esto, el intervalo diastólico en moscas con ausencia de la proteína DJ-1 β se vio significativamente aumentado (Figura 11 C), siendo ésta la posible causa de la disminución en la FC. En cuanto a los demás parámetros estudiados, no se observaron cambios significativos. Sin embargo, vemos una clara tendencia de las máximas velocidades de contracción y relajación a disminuir y del Tau y el índice de arritmias a aumentar (Figura 11 D-G). En conjunto, estos resultados indican que las moscas jóvenes con EP presentan un efecto cronotrópico negativo (disminución de la FC) sin efectos sobre la contractilidad.

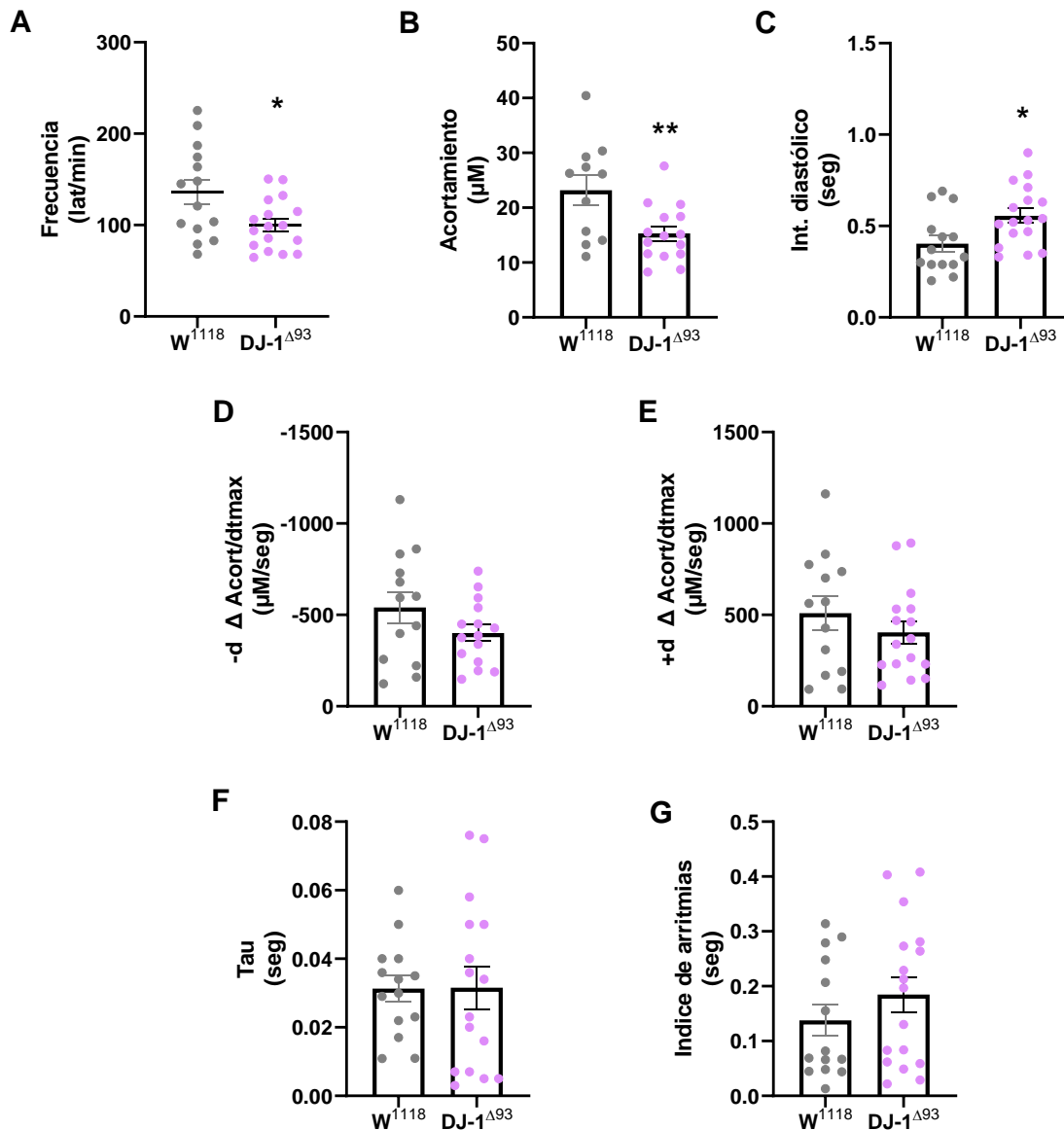


Figura 11. Función cardíaca a los 7 días de edad. Se muestra una disminución de la frecuencia cardíaca (A, $132,14 \pm 13,92$ vs $100,21 \pm 6,76$ n: 14 y 17) y el acortamiento de una de las paredes del corazón (B, $21,46 \pm 2,31$ vs $15,30 \pm 1,39$ n: 11 y 15); junto con un aumento en el intervalo diastólico (C, $0,403 \pm 0,046$ vs $0,58 \pm 0,042$ n= 14 y 17) en moscas *park*. No hay cambios en el índice de arritmias (D, $0,12 \pm 0,02$ vs $,18 \pm 0,03$ n: 14 y 17), las velocidades máximas de contracción y relajación (E y F, $-491,72 \pm 75,50$ vs $-401 \pm 47,67$ $438 \pm 80,05$ vs $403,85 \pm 66,73$ n: 13 y 15); y el Tau (G, $0,029 \pm 0,004$ vs $0,03 \pm 0,008$ n: 14 y 17) entre moscas *park* y *wild type* a los 7 días de edad. Se realizó Test de Student en todos los casos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

En moscas adultas (40 días) pudimos observar el mismo efecto sobre la frecuencia cardíaca, siendo significativamente menor en moscas con DJ-1 β delecionada (Figura 12 A) sin embargo, el acortamiento de una de las paredes del corazón y el intervalo diastólico dejan de mostrar cambios significativos aunque la tendencia se mantiene (Figura 12 B y C). En cuanto a las tendencias observadas tempranamente en la contractilidad cardíaca, se confirman con el tiempo, ya que a los 40 días de edad las

moscas *park* presentaron un enlentecimiento de la relajación y la contracción y un aumento en el Tau y el índice de arritmias con respecto a las moscas control (Figura 12 D-G). Por lo tanto, es claro que el fenotipo cardíaco en moscas con EP expresado a edades tempranas se acentúa con el envejecimiento, presentando las moscas adultas un marcado deterioro en la función cardíaca.

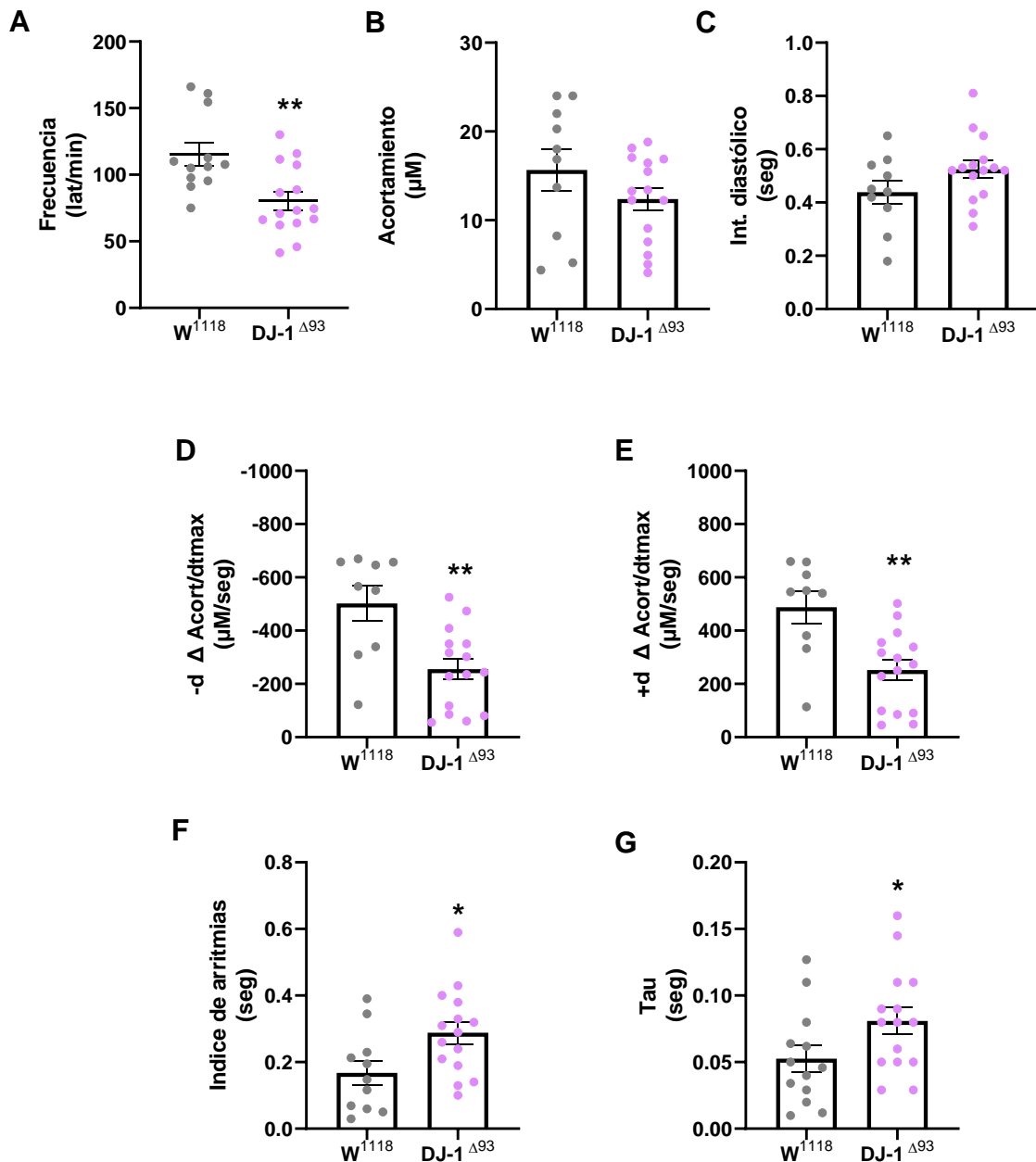


Figura 12. Función cardíaca a los 40 días de edad Se muestra una disminución de la frecuencia cardíaca (A, $110,01 \pm 7,73$ vs $81,53 \pm 7,07$ n: 12 y 15) en las moscas *park* respecto a las *wild type*, mientras que el acortamiento (B, $19,84 \pm 4,69$ vs $11,98 \pm 1,29$ n: 9 y 15) y el intervalo diastólico (C, $0,439 \pm 0,043$ vs

0,52±0,03 n:10 y 15) se mantienen iguales. Se observa una disminución en las velocidades máximas de contracción y relajación (E y F -482,76±71,2 vs -255,56 ± 39,40 466,51± 63,41 vs 251,95 ± 38,46 respectivamente, n: 11 y 15) y un aumento del Tau (G, 0,056±0,01 vs 0,080 ± 0,006 n: 12 y 15) y el índice de arritmias (D, 0,17± 0,03 vs 0,29± 0,03 n:11 y 15) en moscas *park* comparadas con las moscas control. Se realizó Test de Student en todos los casos. * p<0,05; ** p<0,01

Las moscas con EP no presentan cambios en el potencial de membrana mitocondrial

Debido a que la evidencia hasta el momento demuestra que la EP es una enfermedad causada por la disfunción mitocondrial, en este trabajo buscamos conocer el estado de esta organela. Para esto calculamos el potencial de membrana mitocondrial en mitocondrias aisladas de moscas cuando se encuentra ausente la isoforma β del gen DJ-1 tanto en moscas jóvenes como adultas. Comparamos 3 medios de reacción:

- En uno de ellos utilizamos glutamato/malato con el fin de estimular el complejo I de la cadena transportadora de electrones.
- También estudiamos la acción del succinato, siendo éste sustrato del segundo complejo de la cadena transportadora de electrones.
- Ya que se encuentra descrito que cuando el complejo II se estimula puede producirse un flujo inverso de electrones hacia el complejo I produciendo ROS, utilizamos succinato y el inhibidor del complejo I rotenona.

Nuestros resultados mostraron que no hay cambios en los potenciales de membrana mitocondrial en ninguna de las condiciones estudiadas, tampoco entre las distintas líneas de moscas tanto en moscas jóvenes (7 días) (Figura 13) como en moscas adultas (40 días) (Figura 14).

7 días

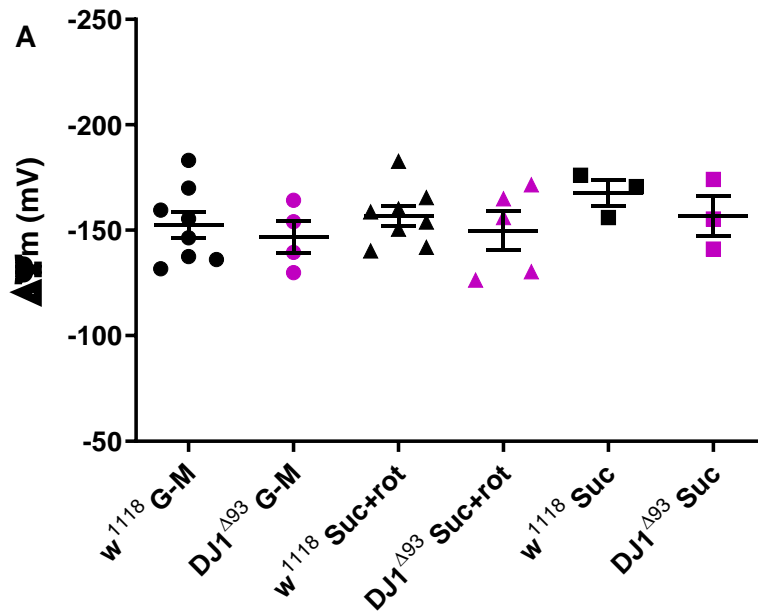


Figura 13. Potencial de membrana mitocondrial a los 7 días de edad. Glutamato/malato (N: 8 y 4); Succinato+Rotenona (N:8 y 5); Succinato (N: 3 y 3) a los 7 días de edad. No se encuentran cambios en el potencial de membrana mitocondrial en los medios estudiados entre moscas *park* y *control* a los 7 días de edad. Se utilizó ANOVA de dos vías para comparar los efectos de las líneas y de los distintos medios.

40 días

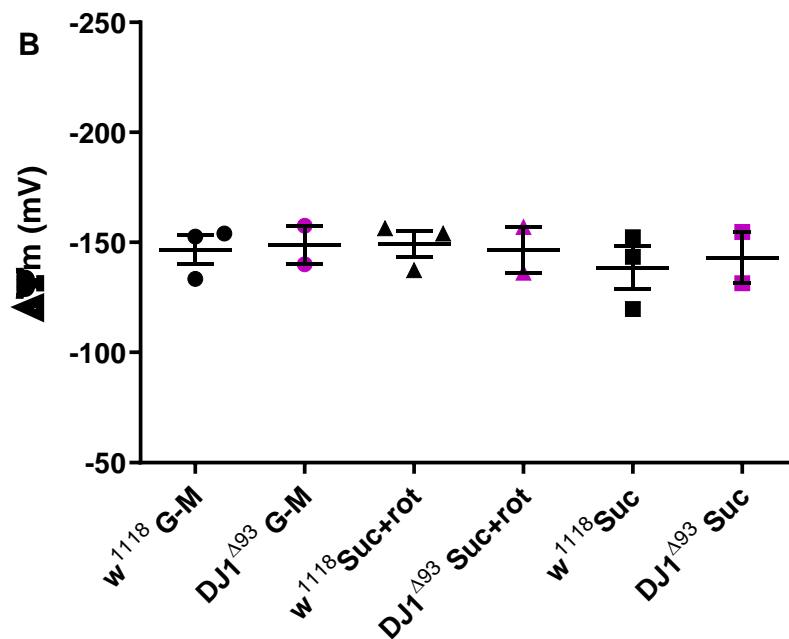


Figura 14. Potencial de membrana mitocondrial a los 40 días de edad. G-M: Glutamato/malato; Suc-Rot: Succinato+Rotenona; Suc: Succinato. No se encuentran cambios significativos en el potencial de membrana mitocondrial en los medios estudiados entre moscas *control* y *park* (n:3 y 2) a los 40 días de edad. Se utilizó ANOVA de dos vías para comparar los efectos de las líneas y de los distintos medios.

La isoforma β de DJ-1 se expresa en el corazón de *Drosophila melanogaster*.

Si bien se encuentra descrito que la isoforma DJ-1 β se expresa de manera ubicua en *D. melanogaster* fue de nuestro interés corroborar la expresión del ARNm de esta proteína en el tejido cardíaco. Además, corroboramos la expresión de la isoforma DJ-1 α . Como tejido control utilizamos cerebros donde ha sido reportada la expresión de ambas isoformas. Como se muestra en la Figura 15, en las moscas control hay expresión del gen *DJ-1 β* tanto en el tejido cardíaco como neuronal. Ahora bien, en cuanto a las moscas *park* se puede observar, como era de esperar, que no hay presencia del ARNm de DJ-1 β en cerebro como tampoco en corazón, confirmando el modelo de EP. En cuanto a la expresión de la isoforma α de DJ-1, se vio que en moscas control hay una expresión leve del ARNm de esta proteína tanto en corazón como en cerebro. Lo mismo ocurre en corazón de moscas *park*. En contraste a esto, en moscas mutantes hay una expresión mayor de la isoforma α en cerebro (Figura 16). Esto concuerda con lo descrito anteriormente por Menzies et al donde se demuestra que las moscas *D. melanogaster* mutantes para DJ-1 β presentan una expresión compensatoria positiva de DJ-1 α , siendo esto una estrategia de rescate de pérdida de función proteica.

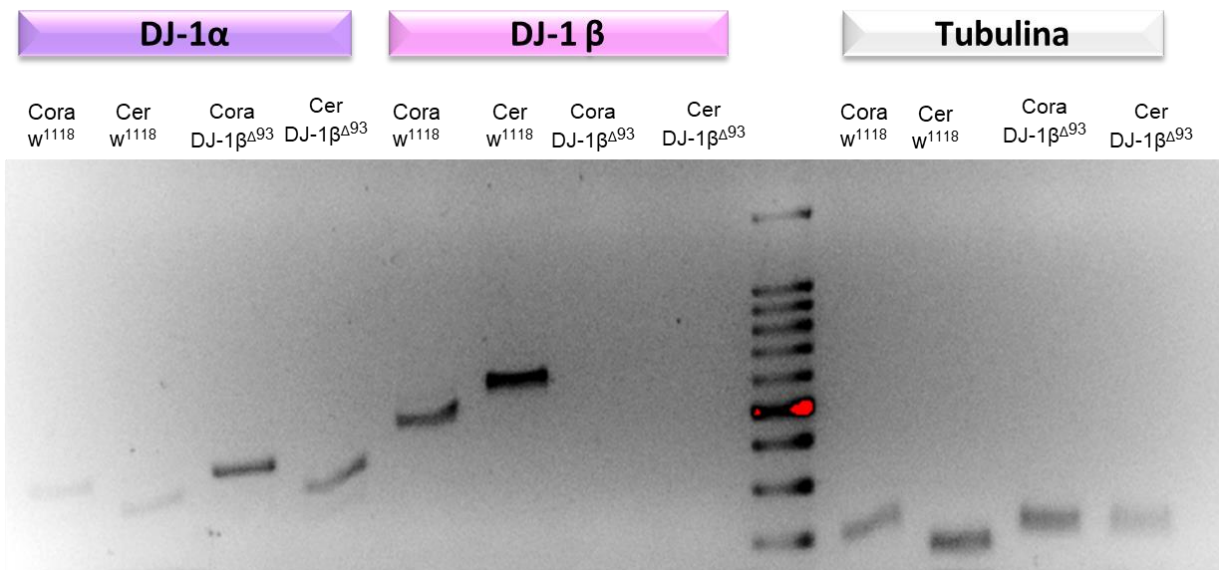


Figura 15. RT-PCR de cerebros y corazones. Se observa expresión de la isoforma α tanto en cerebro como en corazones de moscas *ctrl* y *park* mientras que la isoforma β solo se expresa en cerebros y corazones de moscas *ctrl*. La tubulina se utilizó como control.

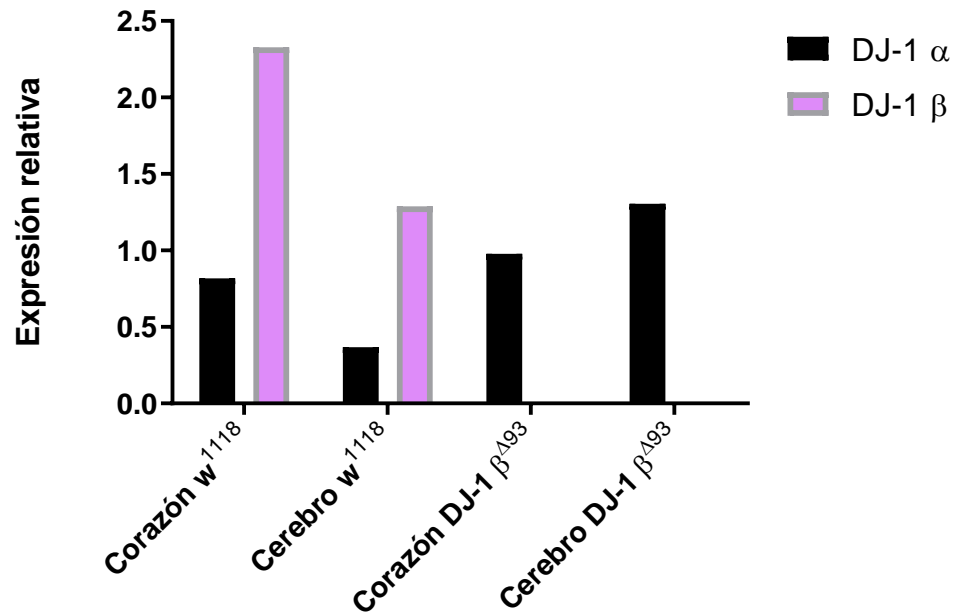


Figura16. Cuantificación de expresión de ADN. Se observa expresión del gen DJ-1 β tanto en cerebro como en corazón de moscas *control*. En moscas mutantes no hay presencia del mismo. El gen DJ-1 α se expresa levemente en corazón y cerebro de moscas *wild type* y en corazón de moscas *park*. Se observa una expresión mayor de este gen en cerebro de moscas mutantes.

Hasta el momento cumplimos el primer objetivo planteado en este trabajo, realizar la caracterización fenotípica y de función cardíaca en moscas *park*. En ellas vimos que el primer síntoma que causa de la delección de DJ-1 β fue un deterioro en la función cardíaca presente en moscas jóvenes, acentuándose con la edad. Además, observamos un claro fenotipo de comportamiento parkinsoniano perdiendo la capacidad de escalado y, que no se encuentran cambios en el potencial de membrana mitocondrial de las moscas con EP a edades distintas. Por último, demostramos que no hay expresión de la isoforma DJ-1 β en corazón ni cerebro de moscas *park*, pero sí de la isoforma DJ-1 α .

Con todo esto, nuestro segundo objetivo fue utilizar una cepa de cannabis alta en CBD como tratamiento para esta enfermedad. Para llevar a cabo esto, tratamos a las moscas con vapor de cannabis administrándoles dos dosis diarias de 40 ml de vapor de cannabis a partir del día 25 de edad, momento en el cuál estos individuos comienzan a presentar un fenotipo de parkinsonismo en relación a la capacidad motora, hasta los 40 días de edad.

El tratamiento crónico con cannabis mejora la capacidad de escalado de las moscas park.

Luego de someter a las moscas *park* a un tratamiento crónico con cannabis se exploró su habilidad de escalado y se encontró que las moscas tratadas presentan una función motora significativamente mayor comparadas con las moscas sin tratar, asemejándose a los valores correspondientes a las moscas *wild type* (Figura 17). Estos resultados sugieren que el tratamiento crónico con un híbrido de *Cannabis sativa* alta en CBD mejora los síntomas motores característicos de la EP.

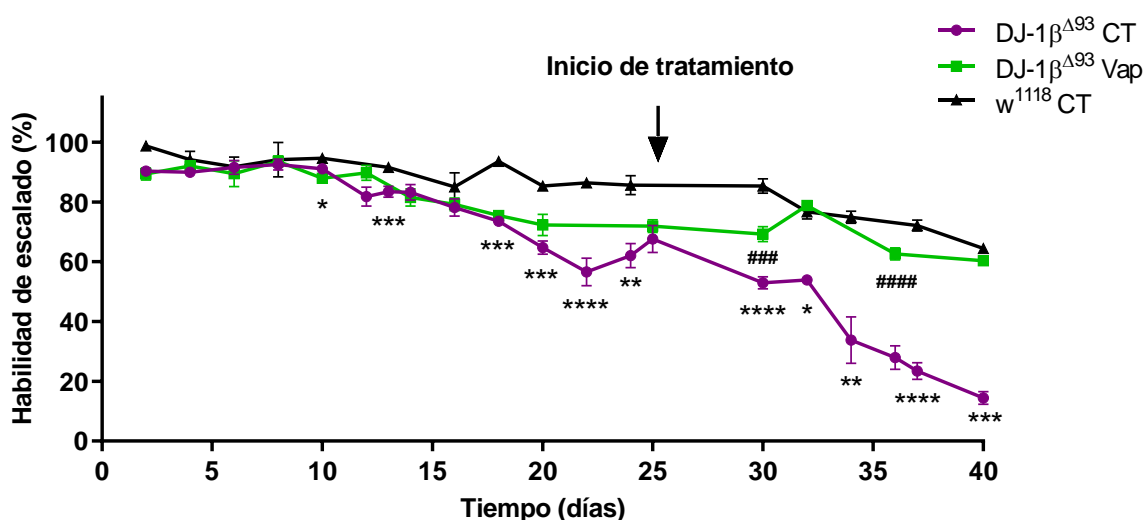


Figura 17. Habilidad de escalado de moscas *park* tratadas y sin tratar . Se observa un aumento significativo en la habilidad de escalado a partir del inicio del tratamiento con cannabis, asemejándose a los valores de las moscas *wild type* . * <0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 **** p<0,0001 respecto a w¹¹¹⁸; ### p<0,001 ####p<0,0001 respecto a DJ-1 $\beta^{\Delta 93}$

El tratamiento con cannabis ayuda a mejorar parcialmente la función cardíaca en moscas con EP.

Luego del tratamiento crónico con vapor de cannabis las moscas *park* mostraron un aumento en la frecuencia cardíaca, restituyendo los valores de FC a valores similares a los de las moscas control (Figura 18 A). Sumado a esto, las moscas sometidas al tratamiento mostraron una disminución en el índice de arritmias, asemejándose a los valores que presentan las moscas sanas w¹¹¹⁸ (Figura 18 G), sugiriendo que las desmejoras que se generan a causa de la ausencia de DJ-1 β se revierten con la utilización de cannabis como terapia. En cuanto a los demás parámetros estudiados: acortamiento de la pared de corazón (Figura 18 B), intervalo diastólico (Figura 18 C), Tau (Figura 18 F) y velocidades máximas de contracción y relajación (Figura 18 D-E),

no mostraron cambios significativos comparando las moscas *park* tratadas con las moscas *park* sin tratar.

Estos resultados sugieren que el cannabis posee un efecto en el corazón actuando sobre la frecuencia cardíaca sin modificar los parámetros de contractilidad cardíaca.

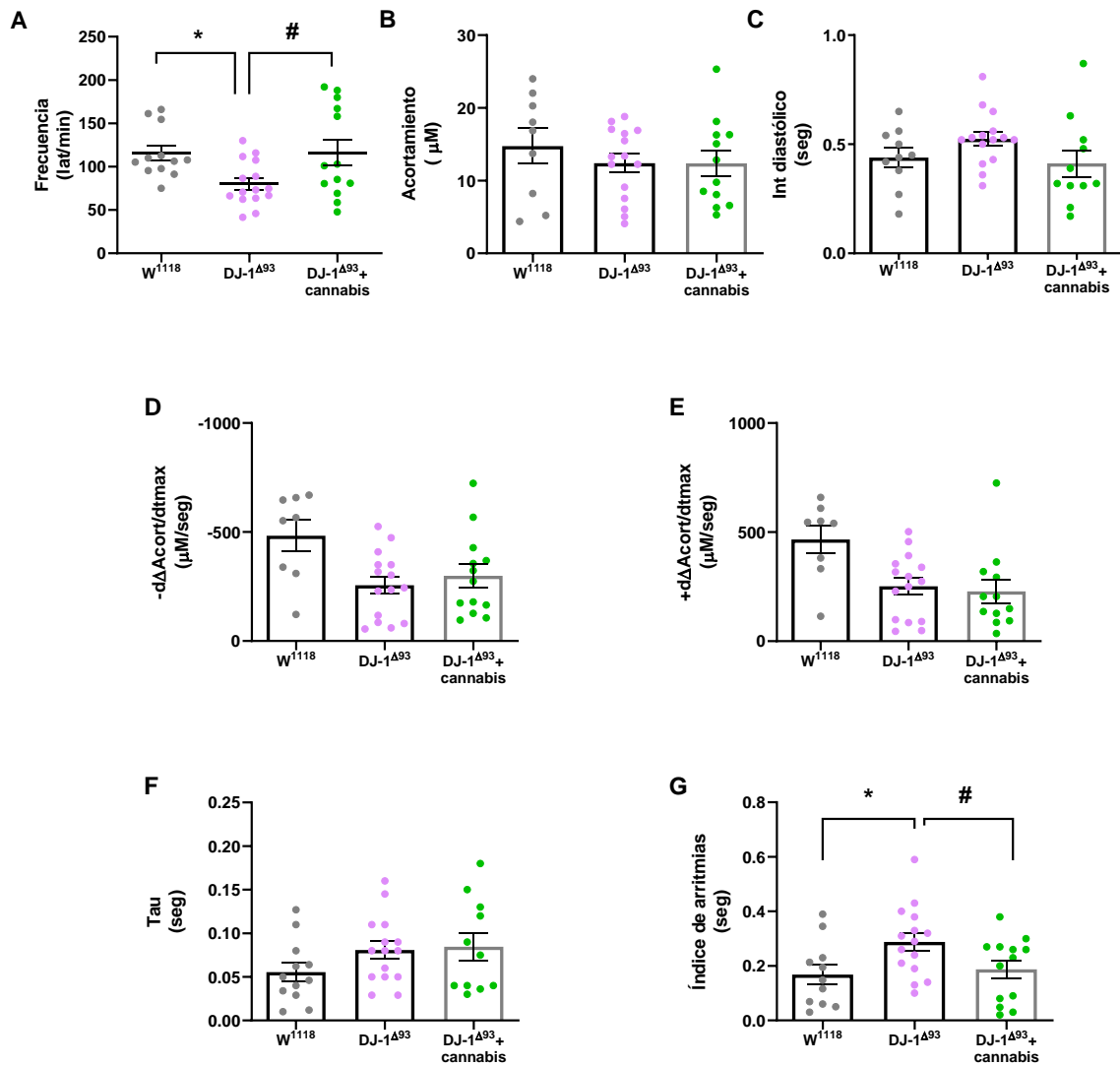


Figura 18. Función cardíaca antes y después del tratamiento con cannabis. Se muestra un aumento significativo en la frecuencia cardíaca (A, $110,01 \pm 7,73$ vs $81,53 \pm 7,07$ vs $1116,23 \pm 14,62$ n: 12, 15 y 13) y una disminución significativa en el índice de arritmias (D, $0,17 \pm 0,03$ vs $0,29 \pm 0,03$ vs $0,18 \pm 0,03$ n: 11, 15 y 13) en moscas mutantes tratadas con cannabis respecto a las mutantes sin tratamiento. En los demás parámetros medidos no se muestran cambios significativos en moscas *park* luego de tratamiento con cannabis; acortamiento de una de las paredes del corazón (B, $19,84 \pm 4,69$ vs $11,98 \pm 1,29$ vs $15,15 \pm 3,20$ n: 9, 15 y 13), intervalo diastólico (C, $0,439 \pm 0,043$ vs $0,52 \pm 0,03$ vs $0,41 \pm 0,06$ n: 10, 15 y 15), velocidades máximas de contracción y relajación (E y F respectivamente $-482,76 \pm 71,2$ vs $-255,56 \pm 39,40$ vs $-299,07 \pm 52,75$ vs $466,51 \pm 63,41$ vs $251,95 \pm 38,46$ vs $310,63 \pm 96,13$ respectivamente, n: 11, 15 y 13) y Tau (H, $0,056 \pm 0,01$ vs $0,080 \pm 0,006$ vs $0,077 \pm 0,016$ n: 12, 15 y 16). ANOVA de una vía. * $p < 0,05$ respecto a *ctrl*; # $p < 0,05$ respecto a DJ-1 $\beta^{\Delta 93}$.

Discusión

En este trabajo final de grado se evaluó por primera vez la función cardíaca en un modelo de *Drosophila melanogaster* con parkinsonismo familiar causado por la delección de DJ-1 β . Además, se estudió cómo el tratamiento crónico con un híbrido de cannabis alto en CBD afecta al fenotipo parkinsoniano.

Demostramos que la delección en DJ-1 β conduce a un fenotipo de EP a nivel motor evidenciado por la disminución de la habilidad de escalado (Figura 10). De manera interesante, los síntomas parkinsonianos comienzan a manifestarse a edades jóvenes (10 días de edad) pronunciándose con el envejecimiento, concordante con las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Por otro lado, encontramos que el primer síntoma como consecuencia de la delección de DJ-1 β fue un deterioro en la función cardíaca. Esto se refleja en una disminución en la frecuencia cardíaca, un menor acortamiento de unas de las paredes del corazón y una prolongación del intervalo diastólico en moscas con EP a los 7 días de edad en comparación con las moscas *wild type* (Figura 11). De manera sorprendente, los efectos a nivel cardíaco se observaron incluso antes que las manifestaciones motoras. De igual manera que con los síntomas motores, pudimos observar una pronunciación en los efectos cardíacos con la edad ya que las moscas *park* adultas presentan una disminución de la frecuencia cardíaca acompañada por una desmejora en la contractilidad cardíaca y un aumento en el índice de arritmias (Figura 12).

Teniendo en cuenta que en este trastorno motor se describió una fuerte disfunción mitocondrial, lo cual podría influir en la acción del músculo cardíaco, estudiamos el estado de esta organela a través de la medición del potencial de membrana mitocondrial en moscas jóvenes de 7 días de edad y en moscas adultas de 40 días de edad. No encontramos cambios significativos en este parámetro estudiado (Figura 13-14). Esto concuerda con lo descrito en 2010 por el equipo de trabajo de Bonini y colaboradores, donde demostraron que el potencial de membrana mitocondrial no se ve afectado en moscas *double knock out* para DJ-1 (DKO) (Hao et al., 2010). Sin embargo, encontraron que las actividades de fosforilación oxidativa y respiración mitocondrial se encontraban disminuidas en moscas DKO, observando una disminución de ~ 40% en el ATP total en moscas envejecidas (Hao et al., 2010). Si bien nuestros resultados muestran que las moscas *park* no presentan cambios en el potencial de membrana mitocondrial, es probable que sí presenten una disminución en el consumo de oxígeno y en la producción de ATP como ha sido descrito para este modelo. Esto podría estar afectando a la funcionalidad de importantes proteínas dependientes de ATP implicadas en llevar a cabo la contracción muscular, como la bomba Ca²⁺ ATPasa del retículo sarco/endoplásmico SERCA que, como indica su nombre, para realizar su función hidroliza moléculas de ATP. En este contexto, el grupo de trabajo de Nuria describió una disminución significativa en la actividad de SERCA en moscas mutantes para DJ-1 β (Solana-Manrique et al., 2021). La actividad cardíaca es altamente dependiente de la actividad de esta bomba de calcio ATPasa (Lipskaia et al., 2011) de hecho, se ha evidenciado que mutaciones puntuales que afectan a la funcionalidad de SERCA en *D. melanogaster* generan una variabilidad en la frecuencia cardíaca

umentando el índice de arritmias (Balcazar et al., 2018). Por lo que la disminución en la actividad de esta proteína podría ser una de las causas del desmejorado funcionamiento cardíaco que observamos.

Es esperable que la ausencia de DJ-1 β genere una disfunción mitocondrial impactando en la síntesis de energía en forma de ATP, lo cual resulta necesaria para llevar a cabo una contracción cardíaca y movimientos motores normales. Este impacto sobre la producción de ATP puede ser independiente de su efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial ya que se ha evidenciado que la proteína DJ-1 se une directamente a la subunidad β F₁ y F₀ del complejo proteico mitocondrial transmembrana ATP sintasa (Chen et al., 2019). En este trabajo de Jonas Elizabeth y colaboradores describieron que esta interacción mejoró la eficiencia de producción de ATP, mientras mutaciones en DJ-1 generaron un desacoplamiento mitocondrial.

Por otra parte, para corroborar que el fenotipo cardíaco observado en moscas *park* es a causa de la ausencia de DJ-1 β en el corazón, decidimos llevar a cabo una retrotranscripción del ARNm con posterior amplificación del ADNc (RT-PCR) de corazones y cerebro (control positivo) tanto en moscas mutantes como *wild type*. A su vez, evaluamos la expresión de la isoforma α de DJ-1 en ambos tejidos. Nuestros resultados mostraron que hay una leve expresión de DJ-1 α tanto en corazón como en cerebro de moscas *wild type*, como así también en el corazón de las moscas *park*. En contraste, se observa una expresión mayor de esta isoforma en el cerebro de moscas *park* (Figura 15 y Figura 16). Esto concuerda con lo descrito por el equipo de Tai Min, donde evidenciaron que moscas mutantes DJ-1 β mostraron tener una supervivencia prolongada de las neuronas dopaminérgicas gracias a una sobreexpresión compensatoria de la isoforma DJ-1 α en el cerebro pero no en el resto del organismo (Menzies et al., 2005). Esto indicaría que el rescate de esta isoforma no es suficiente para prevenir y proteger a los individuos que presentan parkinsonismo del deterioro cardíaco y motor que observamos en este trabajo, y nos confirma que el fenotipo observado efectivamente es causado por la ausencia de la isoforma de DJ-1 β en el tejido cardíaco.

Teniendo en cuenta que uno de los motivos principales de los daños causados en los pacientes con EP es la sobreproducción de ROS y que, por su parte, el CBD presenta fuertes propiedades antioxidantes, nos propusimos explorar qué efectos tiene un tratamiento crónico con cannabis en moscas *park* sobre la función cardíaca y motora. Para esto utilizamos un híbrido de *Cannabis sativa* alta en CBD y sometimos a las moscas mutantes a vapor de cannabis todos los días a partir del día 25 de edad, momento en el cual el fenotipo motor se acentúa. Nuestros resultados mostraron que este tratamiento crónico revirtió las desmejoras motrices presentes en moscas parkinsonianas adultas (40 días) ya que su habilidad de escalado aumentó significativamente en comparación con las moscas *park* sin tratar (Figura 17). En cuanto a la función cardíaca pudimos ver que, luego del tratamiento, las moscas que presentaban delecionada la isoforma DJ-1 β mostraron un aumento significativo en la frecuencia cardíaca y una disminución en el índice de arritmias (Figura 18). Sin embargo, el cannabis no logró revertir los efectos de la deleción de DJ-1 β sobre la

contractilidad. Esto puede deberse a que el efecto del cannabis sea sobre la frecuencia cardíaca o, ya que el inicio del tratamiento con cannabis es bastante posterior a la aparición de los síntomas cardíacos, momento para el cual el efecto de la deleción de DJ-1 β sobre la contractilidad sea irreversible.

En conjunto, estas son evidencias claras de que el cannabis tiene efectos sobre el corazón y la regulación del movimiento en este organismo modelo. Esto concuerda con los resultados antes obtenidos por el equipo de trabajo, donde se demostró que este insecto puede ser utilizado como modelo para estudiar los efectos del cannabis y, en particular, el impacto sobre el sistema cardíaco (Gómez et al., 2019). Además, es importante destacar la importancia de nuestros hallazgos en el acompañamiento del tratamiento para la EP. Las terapias utilizadas hasta el momento para tratar el Parkinson se centran en aliviar los síntomas motores. Estas resultan eficaces y cumplen su objetivo mejorando la calidad de vida de los pacientes, pero generan efectos secundarios en ellos, como, por ejemplo, desmejoras en la función cardíaca (Connolly et al., 2014). En principio, el tratamiento con cannabis no solo aliviaría los principales síntomas de la enfermedad, sino también ayudarían a mantener la funcionalidad del sistema cardíaco, lo cual resulta de suma importancia ya que la insuficiencia cardíaca (IC) es la principal causa de muerte prematura en pacientes con EP familiar (Piqueras-Flores et al., 2018).

Como se mencionó anteriormente, la ausencia de la isoforma β de DJ-1 altera la función mitocondrial afectando el consumo de oxígeno y la síntesis de ATP. Por su parte, se ha probado que el CBD es capaz de modificar la bioenergética mitocondrial, incrementando la tasa de consumo de oxígeno, la capacidad de producción de ATP, la respiración máxima y la capacidad respiratoria de reserva en un modelo de privación de oxígeno-glucosa/reperfusión (OGD/R) en una línea celular neuronal de hipocampo de ratón (Sun et al., 2017). Esta evidencia nos lleva a pensar que, en nuestro organismo modelo, el CBD podría estar actuando de la misma manera. Hasta el momento se encuentra descrito que moscas *D. melanogaster* no presentan los receptores para cannabinoides más conocidos CB1 y CB2, pero sí expresan TRPV (Venkatachalam y Montell, 2007). Esto resulta interesante ya que se ha evidenciado que este receptor es uno con los que interactúa este cannabinoide para cumplir su efecto antiinflamatorio y cardioprotector (Pellati et al., 2018). Por lo que los efectos encontrados en este trabajo podrían estar mediados por la interacción del CBD con estos receptores. Para confirmar esta hipótesis se deberá seguir investigando y conocer así el mecanismo de acción molecular del cannabis en *D. melanogaster*.

Conclusión

La delección sistémica de la isoforma β de DJ-1 conduce a un fenotipo de Enfermedad de Parkinson en *Drosophila melanogaster* evidenciado por la pérdida de capacidad motora. Además, nuestros resultados mostraron por primera vez que en la EP generada por la delección de DJ-1 β se manifiestan síntomas cardíacos incluso antes que los síntomas motores. La función cardíaca en moscas con EP se encuentra desmejorada a los 7 días de edad con un acentuado deterioro con la edad (40 días). Tanto a los 7 como a los 40 días el estado mitocondrial no se encuentra afectado por la delección de DJ-1 β .

El tratamiento con una cepa de cannabis alta en CBD resultó ser eficaz para revertir los efectos motores de la EP producida por la delección de DJ-1 β . Más aún, este tratamiento también logró revertir algunos de los efectos cardíacos producidos por esta mutación. Estos resultados son de gran importancia ya que avalan y dan sustento científico a una práctica que actualmente se encuentra en uso por una parte de los pacientes con EP.

En conjunto los resultados de este trabajo final de grado demuestran que *D. melanogaster* es un modelo genético útil para el estudio a nivel cardíaco de la EP y para explorar los efectos del cannabis como terapia alternativa.

Bibliografía

- Adam-Vizi V. (2005). Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxidants & redox signaling*, 7(9-10), 1140–1149. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.1140>
- Aminoff M. J. (2003). Neuroprotective treatment for Parkinson's disease. *Expert review of neurotherapeutics*, 3(6), 797–804. <https://doi.org/10.1586/14737175.3.6.797>
- Angelova, P. R., & Abramov, A. Y. (2016). Functional role of mitochondrial reactive oxygen species in physiology. *Free radical biology & medicine*, 100, 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.005>
- Atalay, S., Jarocka-Karpowicz, I., & Skrzydlewska, E. (2019). Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(1), 21. <https://doi.org/10.3390/antiox9010021>
- Balcazar, D., Regge, V., Santalla, M., Meyer, H., Paululat, A., Mattiazzi, A., & Ferrero, P. (2018). SERCA is critical to control the Bowditch effect in the heart. *Scientific reports*, 8(1), 12447. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30638-9>
- Bandyopadhyay, S., & Cookson, M. R. (2004). Evolutionary and functional relationships within the DJ1 superfamily. *BMC evolutionary biology*, 4, 6. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-4-6>
- Billia, F., Hauck, L., Grothe, D., Konecny, F., Rao, V., Kim, R. H., & Mak, T. W. (2013). Parkinson-susceptibility gene DJ-1/PARK7 protects the murine heart from oxidative damage in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(15), 6085–6090. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303444110>
- Bisogno, T., Hanus, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, DE, Brandi, I., Moriello, AS, Davis, JB, Mechoulam, R. y Di Marzo, V. (2001). Dianas moleculares del cannabidiol y sus análogos sintéticos: efecto sobre los receptores VR1 vainilloides y sobre la captación celular e hidrólisis enzimática de anandamida. *Revista británica de farmacología*, 134 (4), 845–852. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704327>
- Bonifati, V., Rizzu, P., Squitieri, F., Krieger, E., Vanacore, N., van Swieten, J. C., Brice, A., van Duijn, C. M., Oostra, B., Meco, G., & Heutink, P. (2003). DJ-1 (PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 24(3), 159–160. <https://doi.org/10.1007/s10072-003-0108-0>
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Bridgeman, M. B., & Abazia, D. T. (2017). Medicinal Cannabis: History, Pharmacology, And Implications for the Acute Care Setting. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, 42(3), 180–188.
- Calí, T., Ottolini, D., Negro, A., & Brini, M. (2013). Enhanced parkin levels favor ER-mitochondria crosstalk and guarantee Ca(2+) transfer to sustain cell

-
- bioenergetics. *Biochimica et biophysica acta*, 1832(4), 495–508. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.01.004>
- Canet-Avilés, R. M., Wilson, M. A., Miller, D. W., Ahmad, R., McLendon, C., Bandyopadhyay, S., Baptista, M. J., Ringe, D., Petsko, G. A., & Cookson, M. R. (2004). The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(24), 9103–9108. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402959101>
- Chagas, M. H., Zuardi, A. W., Tumas, V., Pena-Pereira, M. A., Sobreira, E. T., Bergamaschi, M. M., dos Santos, A. C., Teixeira, A. L., Hallak, J. E., & Crippa, J. A. (2014). Effects of cannabidiol in the treatment of patients with Parkinson's disease: an exploratory double-blind trial. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, 28(11), 1088–1098. <https://doi.org/10.1177/0269881114550355>
- Chen, R., Park, H. A., Mnatsakanyan, N., Niu, Y., Licznanski, P., Wu, J., Miranda, P., Graham, M., Tang, J., Boon, A., Cossu, G., Mandemakers, W., Bonifati, V., Smith, P., 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), 469. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1679-x>
- Connolly, B. S., & Lang, A. E. (2014). Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. *JAMA*, 311(16), 1670–1683. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3654>
- Cookson M. R. (2003). Pathways to Parkinsonism. *Neuron*, 37(1), 7–10. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)01166-2](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)01166-2)
- Cookson M. R. (2012). Parkinsonism due to mutations in PINK1, parkin, and DJ-1 and oxidative stress and mitochondrial pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(9), a009415. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009415>
- Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Mitochondria. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9896/>
- de Lau, L. M., & Breteler, M. M. (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet. Neurology*, 5(6), 525–535. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70471-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70471-9)
- 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. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 51(3), 175–188. <https://doi.org/10.1007/s10863-019-09798-4>
- Durst, R., Danenberg, H., Gallily, R., Mechoulam, R., Meir, K., Grad, E., Beeri, R., Pugatsch, T., Tarsish, E., & Lotan, C. (2007). Cannabidiol, a nonpsychoactive Cannabis constituent, protects against myocardial ischemic reperfusion injury. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 293(6), H3602–H3607. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00098.2007>
- Elphick, M. R., & Egertová, M. (2001). The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 356(1407), 381–408. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0787>
- Fernández-Ruiz, J., Sagredo, O., Pazos, M. R., García, C., Pertwee, R., Mechoulam, R., & Martínez-Orgado, J. (2013). Cannabidiol for neurodegenerative disorders: important new clinical applications for this phytocannabinoid?. *British journal*
-

-
- of clinical pharmacology, 75(2), 323–333. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04341.x>
- García-Arencibia, M., González, S., de Lago, E., Ramos, J. A., Mechoulam, R., & Fernández-Ruiz, J. (2007). Evaluation of the neuroprotective effect of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: importance of antioxidant and cannabinoid receptor-independent properties. *Brain research*, 1134(1), 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.11.063>
- Gómez, I. M., Rodríguez, M. A., Santalla, M., Kassis, G., Colman Lerner, J. E., Aranda, J. O., Sedán, D., Andrinolo, D., Valverde, C. A., & Ferrero, P. (2019). Inhalation of marijuana affects *Drosophila* heart function. *Biology open*, 8(8), bio044081. <https://doi.org/10.1242/bio.044081>
- Guzmán, J. N., Sanchez-Padilla, J., Wokosin, D., Kondapalli, J., Ilijic, E., Schumacker, P. T., & Surmeier, D. J. (2010). Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature*, 468(7324), 696–700. <https://doi.org/10.1038/nature09536>
- 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>
- Hayashi, T., Ishimori, C., Takahashi-Niki, K., Taira, T., Kim, Y. C., Maita, H., Maita, C., Ariga, H., & Iguchi-Ariga, S. M. (2009). DJ-1 binds to mitochondrial complex I and maintains its activity. *Biochemical and biophysical research communications*, 390(3), 667–672. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.025>
- Im, J. Y., Lee, K. W., Junn, E., & Mouradian, M. M. (2010). DJ-1 protects against oxidative damage by regulating the thioredoxin/ASK1 complex. *Neuroscience research*, 67(3), 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2010.04.002>
- Irrcher, I., Aleyasin, H., Seifert, E. L., Hewitt, S. J., Chhabra, S., Phillips, M., Lutz, A. K., Rousseaux, M. W., Bevilacqua, L., Jahani-Asl, A., Callaghan, S., MacLaurin, J. G., Winklhofer, K. F., Rizzu, P., Rippstein, P., Kim, R. H., Chen, C. X., Fon, E. A., Slack, R. S., Harper, M. E., ... Park, D. S. (2010). Loss of the Parkinson's disease-linked gene DJ-1 perturbs mitochondrial dynamics. *Human molecular genetics*, 19(19), 3734–3746. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq288>
- Keeney, P. M., Xie, J., Capaldi, R. A., & Bennett, J. P., Jr. (2006). Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. *J Neurosci*, 26(19), 5256–5264. doi:10.1523/jneurosci.0984-06.2006
- Khan, M. A., Hashim, M. J., Mustafa, H., Baniyas, M. Y., Al Suwaidi, S., AlKatheeri, R., Alblooshi, F., Almatrooshi, M., Alzaabi, M., Al Darmaki, R. S., & Lootah, S. (2020). Global Epidemiology of Ischemic Heart Disease: Results from the Global Burden of Disease Study. *Cureus*, 12(7), e9349. <https://doi.org/10.7759/cureus.9349>
- Kim, S. J., Park, Y. J., Hwang, I. Y., Youdim, M. B., Park, K. S., & Oh, Y. J. (2012). Nuclear translocation of DJ-1 during oxidative stress-induced neuronal cell death. *Free radical biology & medicine*, 53(4), 936–950. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.05.035>
- Lipskaia, L., Chemaly, E. R., Hadri, L., Lompre, A. M., & Hajjar, R. J. (2010). Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase as a therapeutic target for heart failure. *Expert opinion on biological therapy*, 10(1), 29–41. <https://doi.org/10.1517/14712590903321462>
-

-
- Lum, J. J., Bauer, D. E., Kong, M., Harris, M. H., Li, C., Lindsten, T., & Thompson, C. B. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, 120(2), 237–248. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.046>
- Menzies, F. M., Yenisseti, S. C., & Min, K. T. (2005). Roles of *Drosophila* DJ-1 in survival of dopaminergic neurons and oxidative stress. *Current biology : CB*, 15(17), 1578–1582. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.03>
- 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 : CB*, 15(17), 1572–1577. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.064>
- Mounsey, R. B., & Teismann, P. (2010). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: pathogenesis and neuroprotection. *Parkinson's disease*, 2011, 617472. <https://doi.org/10.4061/2011/617472>
- Mukherjee, U. A., Ong, S. B., Ong, S. G., & Hausenloy, D. J. (2015). Parkinson's disease proteins: Novel mitochondrial targets for cardioprotection. *Pharmacology & therapeutics*, 156, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.10.005>
- Nakai, A., Yamaguchi, O., Takeda, T., Higuchi, Y., Hikoso, S., Taniike, M., Omiya, S., Mizote, I., Matsumura, Y., Asahi, M., Nishida, K., Hori, M., Mizushima, N., & Otsu, K. (2007). The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nature medicine*, 13(5), 619–624. <https://doi.org/10.1038/nm1574>
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Health and Medicine Division; Board on Population Health and Public Health Practice; Committee on the Health Effects of Marijuana: An Evidence Review and Research Agenda. *The Health Effects of Cannabis and Cannabinoids: The Current State of Evidence and Recommendations for Research*. Washington (DC): National Academies Press (US); 2017 Jan 12. 2, Cannabis. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK425762/>
- Olivas-Aguirre, M., Torres-López, L., Valle-Reyes, J. S., Hernández-Cruz, A., Pottosin, I., & Dobrovinskaya, O. (2019). Cannabidiol directly targets mitochondria and disturbs calcium homeostasis in acute lymphoblastic leukemia. *Cell death & disease*, 10(10), 779. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2024-0>
- Park, J. S., Davis, R. L., & Sue, C. M. (2018). Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: New Mechanistic Insights and Therapeutic Perspectives. *Current neurology and neuroscience reports*, 18(5), 21. <https://doi.org/10.1007/s11910-018-0829-3>
- Parsanejad, M., Bourquard, N., Qu, D., Zhang, Y., Huang, E., Rousseaux, M. W., Aleyasin, H., Irrcher, I., Callaghan, S., Vaillant, D. C., Kim, R. H., Slack, R. S., Mak, T. W., Reddy, S. T., Figeys, D., & Park, D. S. (2014). DJ-1 interacts with and regulates paraoxonase-2, an enzyme critical for neuronal survival in response to oxidative stress. *PloS one*, 9(9), e106601. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106601>
- Pellati, F., Borgonetti, V., Brighenti, V., Biagi, M., Benvenuti, S., & Corsi, L. (2018). Cannabis sativa L. and Nonpsychoactive Cannabinoids: Their Chemistry and Role against Oxidative Stress, Inflammation, and Cancer. *BioMed research international*, 2018, 1691428. <https://doi.org/10.1155/2018/1691428>
-

-
- Peres, F. F., Lima, A. C., Hallak, J., Crippa, J. A., Silva, R. H., & Abílio, V. C. (2018). Cannabidiol as a Promising Strategy to Treat and Prevent Movement Disorders?. *Frontiers in pharmacology*, 9, 482. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00482>
- Piqueras-Flores, J., López-García, A., Moreno-Reig, Á., González-Martínez, A., Hernández-González, A., Vaamonde-Gamo, J., & Jurado-Román, A. (2018). Structural and functional alterations of the heart in Parkinson's disease. *Neurological research*, 40(1), 53–61. <https://doi.org/10.1080/01616412.2017.1390933>
- Rajesh, M., Mukhopadhyay, P., Bátkai, S., Patel, V., Saito, K., Matsumoto, S., Kashiwaya, Y., Horváth, B., Mukhopadhyay, B., Becker, L., Haskó, G., Liaudet, L., Wink, D. A., Veves, A., Mechoulam, R., & Pacher, P. (2010). Cannabidiol attenuates cardiac dysfunction, oxidative stress, fibrosis, and inflammatory and cell death signaling pathways in diabetic cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*, 56(25), 2115–2125. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.07.033>
- Rocha Cabrero F, Morrison EH. Lewy Bodies. [Updated 2020 Jul 11]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536956/>
- Rodrigues, L. D., Oliveira, L. F., Shinoda, L., Scorza, C. A., Faber, J., Ferraz, H. B., . . . Scorza, F. A. (2019). Cardiovascular alterations in rats with Parkinsonism induced by 6-OHDA and treated with Domperidone. *Sci Rep*, 9(1), 8965. doi:10.1038/s41598-019-45518-z
- Sadoshima J, Izumo S. (1997) The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol*. 1997;59:551-71. doi: 10.1146/annurev.physiol.59.1.551.
- Santalla, M., Portiansky E. L., Ferrero P. (2016). *Drosophila melanogaster*, an Emerging Animal Model for the Study of Human Cardiac Diseases. *Revista Argentina de Cardiología*, 84(5), 424-430. doi: 10.7775/ajc.84.5.8711
- Schrot, R. J., & Hubbard, J. R. (2016). Cannabinoids: Medical implications. *Annals of medicine*, 48(3), 128–141. <https://doi.org/10.3109/07853890.2016.1145794>
- Shimizu, Y., Lambert, J. P., Nicholson, C. K., Kim, J. J., Wolfson, D. W., Cho, H. C., Husain, A., Naqvi, N., Chin, L. S., Li, L., & Calvert, J. W. (2016). DJ-1 protects the heart against ischemia-reperfusion injury by regulating mitochondrial fission. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 97, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.04.008>
- Smith, N., & Wilson, M. A. (2017). Structural Biology of the DJ-1 Superfamily. *Advances in experimental medicine and biology*, 1037, 5–24. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6583-5_2
- 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), 166152. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166152>
- Sun, S., Hu, F., Wu, J., & Zhang, S. (2017). Cannabidiol attenuates OGD/R-induced damage by enhancing mitochondrial bioenergetics and modulating glucose metabolism via pentose-phosphate pathway in hippocampal neurons. *Redox biology*, 11, 577–585. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.029>
- Surmeier, D. J., Guzman, J. N., Sanchez, J., & Schumacker, P. T. (2012). Physiological phenotype and vulnerability in Parkinson's disease. Cold Spring Harbor
-

-
- perspectives in medicine, 2(7), a009290.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009290>
- Tao, X., & Tong, L. (2003). Crystal structure of human DJ-1, a protein associated with early onset Parkinson's disease. *The Journal of biological chemistry*, 278(33), 31372–31379. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304221200>
- Thomas, A., Baillie, G. L., Phillips, A. M., Razdan, R. K., Ross, R. A., & Pertwee, R. G. (2007). Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *British journal of pharmacology*, 150(5), 613–623. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707133>
- Thomas, K. J., McCoy, M. K., Blackinton, J., Beilina, A., van der Brug, M., Sandebring, A., Miller, D., Maric, D., Cedazo-Minguez, A., & Cookson, M. R. (2011). DJ-1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway to control mitochondrial function and autophagy. *Human molecular genetics*, 20(1), 40–50.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddq430>
- Venkatachalam, K., & Montell, C. (2007). TRP channels. *Annual review of biochemistry*, 76, 387–417.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>
- Vogler, G., & Ocorr, K. (2009). Visualizing the beating heart in *Drosophila*. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (31), 1425. <https://doi.org/10.3791/1425>
- Wang, X., Petrie, T. G., Liu, Y., Liu, J., Fujioka, H., & Zhu, X. (2012). Parkinson's disease-associated DJ-1 mutations impair mitochondrial dynamics and cause mitochondrial dysfunction. *Journal of neurochemistry*, 121(5), 830–839. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07734.x>
- Yellon, D. M., & Hausenloy, D. J. (2007). Myocardial reperfusion injury. *The New England journal of medicine*, 357(11), 1121–1135.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra071667>
- Zahoor I, Shafi A, Haq E. Pharmacological Treatment of Parkinson's Disease. In: Stoker TB, Greenland JC, editors. *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects* [Internet]. Brisbane (AU): Codon Publications; 2018 Dec 21. Chapter 7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536726/>
doi: 10.15586/codonpublications.parkinsonsdisease.2018.ch7
- Zhang, L., Shimoji, M., Thomas, B., Moore, D. J., Yu, S. W., Marupudi, N. I., Torp, R., Torgner, I. A., Ottersen, O. P., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2005). Mitochondrial localization of the Parkinson's disease related protein DJ-1: implications for pathogenesis. *Human molecular genetics*, 14(14), 2063–2073.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddi211>
- 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>
- Zhong, N., & Xu, J. (2008). Synergistic activation of the human MnSOD promoter by DJ-1 and PGC-1alpha: regulation by SUMOylation and oxidation. *Human molecular genetics*, 17(21), 3357–3367. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn230>
- Zuardi, A. W., Crippa, J. A., Hallak, J. E., Pinto, J. P., Chagas, M. H., Rodrigues, G. G., Dursun, S. M., & Tumas, V. (2009). Cannabidiol for the treatment of psychosis in Parkinson's disease. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, 23(8), 979–983. <https://doi.org/10.1177/0269881108096519>
-