

TRABAJO DE FINAL DE GRADO



**EL PEZ CEBRA ADULTO COMO
MODELO FARMACOLÓGICO PARA EL
ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE
PARKINSON**

REVISIÓN SISTEMÁTICA
CURSO 2022-2023

GRADO EN MEDICINA

Autor: Carles Marián Carrasco

Tutor: Javier Santos Burgos Muñoz

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	3
2. RESUMEN	4
3. ABSTRACT.....	5
4. EXTENDED SUMMARY	6
5. INTRODUCCIÓN	8
5.1. ANTECEDENTES.....	8
5.2. JUSTIFICACIÓN	11
5.3. OBJETIVOS	15
6. METODOLOGÍA	16
6.1. CRITERIOS DE ELEGIBILIDAD	16
6.2. FUENTES DE INFORMACIÓN	16
6.3. ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA	16
6.4. PROCESO DE SELECCIÓN DE LOS ESTUDIOS.....	17
6.5. PROCESO DE EXTRACCIÓN DE LOS DATOS	18
6.6. EVALUACIÓN DEL RIESGO DE SESGO DE LOS ESTUDIOS INDIVIDUALES	18
6.7. ANÁLISIS Y SÍNTESIS	18
7. RESULTADOS.....	19
7.1. SELECCIÓN DE LOS ESTUDIOS	19
7.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS ESTUDIOS	19
7.3. RIESGO DE SESGO DE LOS ESTUDIOS INDIVIDUALES	20
7.4. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS INDIVIDUALES	20
7.5. SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS.....	27
8. DISCUSIÓN	29
9. CONCLUSIONES	32
10. BIBLIOGRAFÍA	35
11. ANEXOS	37

1. ABREVIATURAS

6-OHDA: 6-hidroxi dopamina

AE: alternancia espontánea.

BHE: barrera hematoencefálica.

EP: enfermedad de Parkinson.

i.c.v.: intracerebroventricular.

i.p.: intraperitoneal.

IAT: *inhibitory avoidance test*.

MAO: monoaminooxidasa.

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

ND: neuronas dopaminérgicas.

PC: pez cebra.

PQ: paraquat.

ROT: rotenona.

TH: tirosina hidroxilasa

2. RESUMEN

Entre los modelos animales disponibles para el estudio de la enfermedad del Parkinson, el pez cebra se ha popularizado en los últimos años por su facilidad de mantenimiento, su rápida reproducción y el bajo costo de mantenimiento, siendo ideal para realizar estudios a gran escala ya que tiene un mayor rendimiento que otros modelos animales.

El objetivo de la revisión es comparar la eficacia de los modelos farmacológicos en el estudio de la enfermedad de Parkinson en el pez cebra mediante el uso de varias neurotoxinas: MPTP, 6-OHDA, rotenona y paraquat

Para ello se realizó una revisión sistemática a través de la búsqueda de artículos en Pubmed y Scopus con palabras clave, ecuaciones de búsqueda y filtros. Se extrajeron los datos de los estudios en una tabla y se analizó la evidencia de estos, analizándose su calidad y su riesgo de sesgo.

Se analizaron en 11 artículos las características de los diferentes modelos farmacológicos del pez cebra. La 6-OHDA produce una reducción de las neuronas dopaminérgicas y una afectación de la capacidad motora, con una posterior recuperación. En el MPTP se observaron alteraciones en la microbiota, en las interacciones sociales, hipoactividad, una disfunción mitocondrial y una alteración de los patrones de movimiento. Respecto al paraquat los resultados difirieron, afectando a la conducta social en un artículo y a la locomoción, y a la memoria espacial en otro. En el modelo de la rotenona se afectaron los niveles de dopamina, la locomoción y otras capacidades no motoras.

El pez cebra ha demostrado ser una excelente alternativa para su uso como modelo farmacológico en el estudio de la enfermedad de Parkinson.

Palabras clave: “Enfermedad de Parkinson”, “pez cebra”, “6-OHDA”, “MPTP”, “paraquat”, “rotenona”.

3. ABSTRACT:

Among the animal models available for studying Parkinson's disease, the zebrafish has become a popular model due to its ease of maintenance, rapid reproduction, and low maintenance costs, making it ideal for conducting large-scale studies with higher efficiency than other animal models.

The objective of the systematic review is to compare the efficacy of pharmacological models in studying Parkinson's disease in zebrafish using various neurotoxins: MPTP, 6-OHDA, rotenone and paraquat.

A systematic review was conducted by searching for articles in PubMed and Scopus using keywords, search equations, and filters. Data from the studies were extracted into a table, and the evidence was analyzed, assessing its quality and risk of bias.

In 11 articles, the characteristics of different pharmacological models in zebrafish were analyzed. 6-OHDA produces a reduction in dopaminergic neurons and an impairment of motor ability, with subsequent recovery. In the MPTP model, alterations in microbiota, social interactions, hypoactivity, mitochondrial dysfunction, and altered movement patterns were observed. Regarding paraquat, results were heterogeneous among articles, affecting social behavior in one article and locomotion, and spatial memory in another. In the rotenone model, dopamine levels, locomotion, and other non-motor abilities were affected.

Zebrafish has demonstrated to be an excellent alternative for use as a pharmacological model in studying Parkinson's disease.

Keywords: "Parkinson's disease", "zebrafish", "6-OHDA", "MPTP", "paraquat", "rotenone".

4. EXTENDED SUMMARY

Parkinson's disease is a chronic neurodegenerative disorder that affects more than 7 million people worldwide and is the most common movement disorder. The main motor symptoms are tremors, rigidity, bradykinesia/akinesia, and postural instability, while non-motor symptoms include gastrointestinal manifestations, neuropsychiatric manifestations (memory impairment, hallucinations, psychosis, mood disturbances such as depression), autonomic manifestations (orthostatic hypotension, urinary incontinence, excessive sweating), sleep disturbances, and olfactory impairments.

Generating animal models of disease remains a challenge today, but at the same time, it is one of the most important tools for studying diseases and developing drugs and therapies. Among the available animal models, zebrafish has become a popular model organism due to its ease of maintenance, rapid reproduction, and the fact that its organs and systems are very similar to those of mammals. The ease and low cost of maintenance make zebrafish an ideal model for large-scale studies with greater efficiency compared to other animal models, allowing for a much larger sample size without sacrificing a complex vertebrate central nervous system. This makes zebrafish ideal for screening potential pharmacological therapies.

This systematic review seeks to compare the efficacy of pharmacological models in the study of Parkinson's disease in zebrafish. The quality of studies using these models will be evaluated, the advantages and limitations of each model will be identified, and their relevance for use in Parkinson's disease research will be discussed. The objective of this review is to provide a comprehensive evaluation of the available models and compare them to the information present in previous scientific literature.

A systematic review was conducted by searching for articles in Pubmed and Scopus using keywords, search equations, and filters. The keywords used for the search were "Parkinson's disease," "zebrafish," "6-OHDA," "MPTP," "paraquat," and "rotenone." Once the search was conducted and the articles with the previously described equations were obtained, the studies were read to

determine if they met the inclusion or exclusion criteria. After this reading, articles that did not fit the criteria were eliminated. Subsequently, duplicate articles were removed, and the full text of the remaining articles was analyzed. The data from the studies were also extracted into a table and their evidence was analyzed, assessing their quality and risk of bias.

The characteristics of different pharmacological models in zebrafish were analyzed in 11 articles. In models with 6-OHDA, an ablation of dopaminergic neurons was observed, affecting motor capacity with subsequent recovery of the damaged neurons. Regarding articles that studied MPTP, alterations in the microbiota, hypoactivity, reduced social interactions, dopaminergic neuronal death leading to motor and sensory phenotype impairment, mitochondrial dysfunction, changes in the regulation of some proteins involved in certain neurological pathways, abnormal swimming phenotypes, and decreased cognitive and memory abilities were observed. With respect to paraquat, there was heterogeneity in the information, with one article showing an increase in aggression and a decrease in defensive behaviors without locomotor alterations, while another study showed significant locomotor impairment and disruption of spatial memory but no alterations in social behavior. Finally, the effects of rotenone were summarized as a decrease in dopamine release and reuptake, alterations in locomotion and learning capacity, modifications in gene expression, and olfactory deficits.

Zebrafish has proven to be an excellent alternative for use as a model in the study of Parkinson's disease. Currently, neurotoxins (6-OHDA, MPTP, paraquat, and rotenone) allow for modeling of Parkinson's disease in zebrafish, each with its own characteristics that make them suitable depending on the research question posed in the study, although there are also some limitations.

5. INTRODUCCIÓN

5.1. ANTECEDENTES

La enfermedad de Parkinson (EP) es una patología neurodegenerativa crónica que afecta a más de 7 millones de personas en todo el mundo, siendo el trastorno neurodegenerativo del movimiento más frecuente (1). Los síntomas motores principales son temblores, rigidez, bradicinesia/acinesia e inestabilidad postural, mientras que los no motores incluyen manifestaciones gastrointestinales, manifestaciones neuropsiquiátricas (alteración de la memoria, alucinaciones, psicosis, alteraciones del estado del ánimo como depresión), manifestaciones autonómicas (hipotensión ortostática, incontinencia urinaria, sudoración excesiva), alteraciones del sueño y alteraciones en el olfato.

La EP se caracteriza por una pérdida de neuronas dopaminérgicas (ND) en la sustancia nigra pars compacta. Esta porción del mesencéfalo es importante para el control motor porque manda neurotransmisores dopaminérgicos al núcleo estriado a través de la vía nigroestriada de la dopamina. Al perderse las proyecciones dopaminérgicas hacia el estriado, se produce la disrupción de la capacidad motora, que resulta en la EP.

A pesar de los avances en el conocimiento de la enfermedad, aún se desconoce la etiología y no hay cura (aunque existen tratamientos sintomáticos basados en levodopa y otros moduladores dopaminérgicos). Se cree que su etiología es consecuencia de una combinación de factores genéticos y ambientales que terminan produciendo una pérdida de ND en la sustancia nigra pars compacta y una acumulación de cuerpos de Lewy (depósitos anormales de proteína llamada alfa-sinucleína) (1).

Se trata de una enfermedad multifactorial, ya que contribuyen factores genéticos y ambientales. En relación a los factores genéticos se han identificado mutaciones en distintos genes (parkina, pink1, dj-1 y lrrk2 entre otros) (2) que se relacionan con las formas familiares de la enfermedad con un patrón de herencia dominante o recesivo, aunque el 85% de casos donde no se puede identificar una mutación o que no presentan patrones de herencia específicos se consideran de origen esporádico (3). Además, existen otros factores de susceptibilidad genética que elevan el riesgo a presentar la EP (4), más aún si se correlacionan con factores ambientales o con el envejecimiento. Entre los

factores ambientales identificados, existe una evidencia fuerte de que la exposición a ciertos pesticidas (ya retirados del mercado en Europa) aumenta el riesgo de padecer EP, y una evidencia débil de que el consumo elevado de leche en hombres, una ingesta alta en hierro y una anemia crónica aumentan el riesgo de padecer EP (5).

Para la búsqueda de soluciones para la EP se necesitan modelos de estudio. La generación de modelos animales de enfermedades sigue siendo un reto en la actualidad, pero al mismo tiempo es una de las herramientas más importantes para el estudio de enfermedades y el desarrollo de fármacos y terapias. Los modelos farmacológicos implican la exposición del animal a neurotoxinas que induzcan la neurodegeneración, la disfunción mitocondrial y otros procesos patológicos que se cree que están involucrados en la EP.

A continuación se revisan las principales sustancias neurotóxicas que inducen la degeneración típica de la EP y que permiten el estudio de los mecanismos subyacentes de la enfermedad y la evaluación de nuevas terapias.

MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahidropiridina)

La administración de MPTP genera una disfunción en el control del movimiento a través de la degeneración de las ND necesarias para modular las rutas neuronales implicadas en el movimiento. El MPTP es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica (BHE). Una vez llega al cerebro se convierte en MPP+ gracias a la monoaminoxidasa B (MAO-B). Posteriormente, se transporta a las ND a través de la proteína transportadora de dopamina (DAT), debido a la similitud entre la estructura de la dopamina y el MPP+ (6).

Los efectos tóxicos de MPTP son más graves en las ND, aunque también se pueden ver afectadas las neuronas serotoninérgicas en menor medida. En cambio, los efectos de MPP+ no afectan al clúster serotoninérgico, indicando una función más específica (7). La presencia del MPP+ dentro de las ND es tóxica, ya que inhibe la cadena de transporte electrónica mitocondrial (complejo I) generando disfunción mitocondrial, estrés oxidativo y neuroinflamación, provocando finalmente la muerte neuronal (6).

Los modelos animales se han utilizado ampliamente para el estudio de los efectos producidos por el MPTP. La neurotoxicidad dopaminérgica del MPTP se ha observado en la carpa dorada (*Carassius auratus*). En roedores se ha observado efecto neurotóxico en las ND del MPTP, al igual que trastornos de la conducta (8). En cambio, las ratas no son sensibles al efecto del MPTP (9).

6-OHDA (6-Hydroxydopamina)

La 6-OHDA es un análogo de la dopamina altamente oxidable que puede ser capturado a través del transportador de dopamina, lo cual lo hace específico para afectar a las neuronas catecolaminérgicas tales como las ND de la sustancia nigra pars compacta (10).

El mecanismo por el que la toxina produce estos efectos se basa en su capacidad para generar peróxido de hidrógeno y radicales superóxido e hidroxilo gracias a su capacidad de autooxidación, la formación de peróxido de hidrógeno por efecto de la monoaminoxidasa y la inhibición directa del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (10). Finalmente, se terminan produciendo especies reactivas de oxígeno que conducen a la muerte celular.

En ratones la administración de 6-OHDA se ha estudiado previamente, demostrando producir una pérdida de más del 95% de la dopamina a nivel del estriado y desequilibrios en el comportamiento (11).

Paraquat

El paraquat (PQ) es un herbicida utilizado en agricultura que presenta una toxicidad potencial tanto en humanos como en otras especies (12) y su exposición crónica puede resultar en síndromes parkinsonianos (13). El PQ actúa principalmente en las ND debido a la especificidad que tiene con el transportador usado por la L-Dopa (12). Cuando el PQ es absorbido en la neurona, cruzando la membrana mitocondrial interna y siendo reducido por el complejo I de la cadena de transporte electrónica, reacciona con el oxígeno generando el anión superóxido. Las ND son especialmente sensibles al estrés oxidativo desencadenado por aniones superóxido a través de ciclos de oxidación-reducción (12). Este desequilibrio en las reacciones de oxidación-reducción producido por el PQ puede estar asociado a trastornos neuronales y alteraciones del comportamiento (12).

Además, el PQ estructuralmente es muy similar al MPP+ y se asocia a un riesgo aumentado para desarrollar EP (7,13).

En estudios realizados en ratas tratadas crónicamente con PQ se han observado alteraciones significativas en lo referente a comportamientos ansiosos, pérdida de discriminación olfatoria y déficits motores (14). En roedores, la administración sistémica de PQ ha demostrado afectar al transportador de dopamina (DAT), así como al metabolismo de dopamina en las neuronas de la sustancia nigra y el estriado (15). La administración subcrónica de PQ también ha demostrado influenciar el metabolismo de la dopamina y causar estrés oxidativo y muerte celular en ratas (16).

Rotenona

La rotenona es un pesticida usado comúnmente en el pasado en la agricultura y la pesca. La exposición a la rotenona se ha relacionado con un riesgo aumentado para el desarrollo de la EP (17). La administración de rotenona reproduce varios síntomas de la EP en las ratas como la hipocinesia y la rigidez. Se trata de una toxina liposoluble capaz de penetrar la barrera hematoencefálica (18).

La rotenona es capaz de inhibir la función del complejo I mitocondrial, resultando en la pérdida de ND (19).

En ratas, la rotenona causa una degeneración de las ND en la vía nigroestriada, provocando el desarrollo de un fenotipo caracterizado por hipocinesia y rigidez severa.

5.2. JUSTIFICACIÓN

Los modelos animales son herramientas esenciales para el estudio de la EP y otras enfermedades neurodegenerativas, ya que permiten entender los procesos biológicos subyacentes, permitiendo y acelerando el desarrollo de terapias. Aunque los modelos animales no pueden replicar completamente las interacciones biológicas complejas que se producen en los seres humanos, permiten el estudio de las enfermedades viendo como ciertos genes o factores ambientales contribuyen a la progresión de la enfermedad. Además, los modelos animales pueden ser utilizados para evaluar la eficacia y seguridad de nuevos tratamientos.

Entre los modelos más utilizados encontramos:

- Ratonés: estos modelos pueden ser modificados genéticamente para expresar genes humanos asociados a distintas enfermedades neurodegenerativas, permitiendo su estudio y su contribución a la enfermedad, además de que se pueden reproducir en grandes cantidades y son relativamente económicos de mantener y criar. Aun así, comparados con el pez cebra (**PC**) son más caros de mantener y criar, además de tener un ciclo de vida más largo.
- Moscas de las fruta (*Drosophila melanogaster*): tienen un sistema nervioso relativamente simple, lo que facilita el estudio de las enfermedades y las terapias, se pueden producir en grandes cantidades a un costo bajo y son muy fáciles de manipular genéticamente. A pesar de todo esto, son muy diferentes de los seres humanos en términos fisiológicos y neurológicos, además de no poder estudiarse el comportamiento complejo (20) de las moscas como sí se puede hacer en otros modelos como el **PC**.
- *Caenorhabditis elegans*: son gusanos muy fáciles de manipular genéticamente, se pueden reproducir en grandes cantidades y tienen únicamente 302 neuronas, por lo que son fáciles de estudiar (20). Entre sus inconvenientes destacan las grandes diferencias respecto al ser humano en términos de su fisiología y neurología, no se puede estudiar el comportamiento complejo.
- Primates no humanos: estos animales son muy cercanos a los seres humanos en términos de fisiología, comportamiento y función neurológica y pueden ser entrenados para realizar tareas complejas permitiendo un estudio más detallado de su comportamiento. En cuanto a los inconvenientes de este modelo, son animales costosos de mantener y criar, limitando la cantidad de animales que se pueden utilizar en los estudios y además existe una gran regulación por el debate ético que suponen los estudios realizados en primates.
- **Pez cebra** (*Danio rerio*): es un ciprínido de agua dulce que comparte más del 80% del genoma con los humanos. Es un vertebrado que mide de 3 a 4 cm habitualmente, alcanzando los 5 cm como talla máxima por lo que es fácil de almacenar y de mantener. Sus embriones son transparentes,

lo que hace posible observar sus órganos en formación. Además se reproducen durante todo el año; las hembras ponen hasta 200 huevos, que se desarrollan rápidamente. También tiene la capacidad de regenerar órganos que hayan sido parcialmente amputados.

Entre los modelos animales disponibles, en los últimos años el PC se ha convertido en un organismo modelo popular debido a su facilidad de mantenimiento, rápida reproducción y al hecho de que sus órganos y sistemas son muy similares al de los mamíferos. La facilidad y el bajo costo de mantenimiento hacen que el PC sea un modelo ideal para realizar estudios a gran escala con un mayor rendimiento en comparación a otros modelos animales, permitiendo incluir un tamaño muestral mucho mayor y sin dejar de tener un sistema nervioso central vertebrado complejo. Esto hace al PC ideal en el cribado de potenciales terapias farmacológicas.

El PC, aparte de ser un vertebrado y, por ello, un modelo más cercano a los humanos que los invertebrados, tiene numerosas ventajas respecto a otros modelos vertebrados. Entre estas se encuentra la capacidad de las hembras de realizar puestas de varios cientos de huevos, de que sus embriones sean transparentes, con la consecuente facilidad para ser visualizados y manipulados experimentalmente en los diferentes ensayos, además de su tiempo de generación corto (2-3 meses) y sus reducidos costes, comparados con otros modelos experimentales (2).

También se ha demostrado que el PC es particularmente útil como modelo para el estudio de enfermedades humanas. Comparado con otros modelos vertebrados, los cribajes genéticos para PC mutantes son más baratos y fáciles de producir, por lo que permiten profundizar en el conocimiento de las enfermedades humanas. Además, el genoma del PC ha sido completamente secuenciado, lo que permite estudiar los genes involucrados en enfermedades neurodegenerativas.

Los humanos y los PC comparten la organización neuroanatómica básica de su sistema nervioso central, pero a diferencia de los mamíferos, los PC no tienen un sistema dopaminérgico mesencefálico. En su defecto, los núcleos a nivel

dorsal en la porción ventral del telencéfalo se han identificado como equivalentes al cuerpo estriado humano (21).

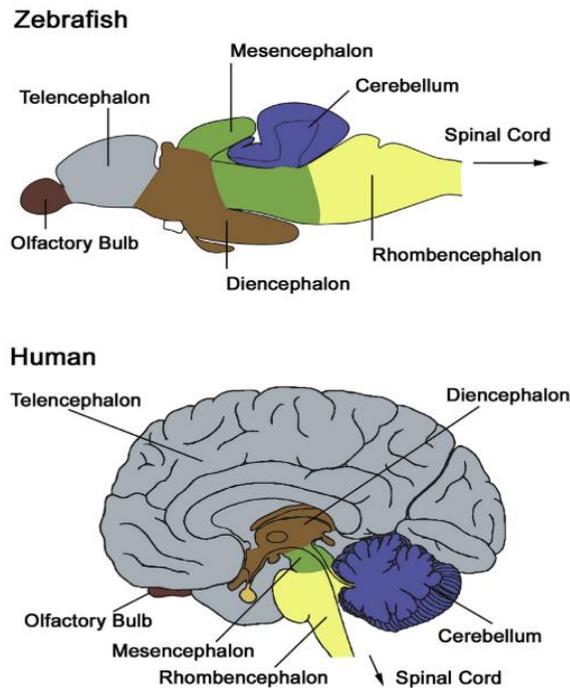


Figura 1. Conservación de la organización del SNC entre PC y humanos (21).

Las proyecciones dopaminérgicas surgen de las neuronas localizadas en el tubérculo posterior diencefálico que ascienden hasta el telencéfalo, siendo el equivalente a la vía nigroestriada en los humanos.

Los PC también comparten el mismo sistema de neurotransmisión con otros vertebrados. Entre los neurotransmisores que comparten PC y mamíferos encontramos el glutamato, el GABA, las catecolaminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina), la serotonina, la acetilcolina, la histamina y la glicina.

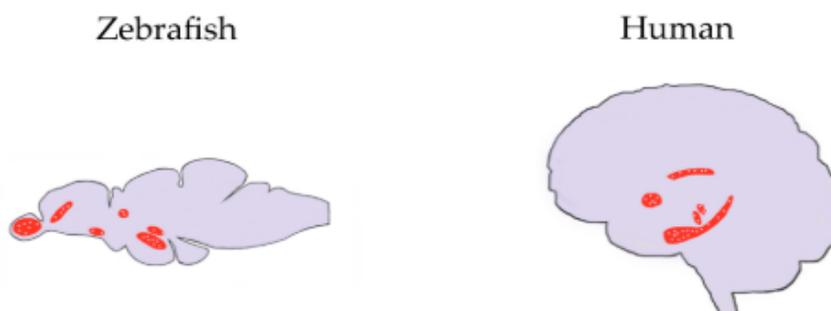


Figura 2. Distribución de la dopamina en el cerebro del PC y del humano (22).

Las catecolaminas son consideradas neurotransmisores moduladores, ejerciendo su función a través de la unión a receptores ligados a proteínas G, relacionándose con el movimiento, la recompensa, la memoria y las enfermedades neuropsiquiátricas como la EP. La tirosina hidroxilasa (TH) es la primera enzima en la síntesis de las catecolaminas. Estas se transportan en vesículas por el cerebro por miembros de la familia de transportadores SLC18. Las catecolaminas son metabolizadas por las MAO (monoamino oxidasas), siendo un metabolito principal de la dopamina el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) que es producto de las MAO y la aldehído deshidrogenasa (22).

En resumen, el uso del PC puede ayudar a reducir los costos de investigación en comparación con otros modelos animales. Gracias a este modelo, se puede acelerar y abaratar el proceso para el estudio de modelos intermedios entre los más simples y los más complejos, debido a su fácil y económico mantenimiento, su rápido ciclo de vida y la posibilidad de llevar a cabo estudios a gran escala en menor tiempo.

5.3. OBJETIVOS

En esta revisión sistemática, se busca comparar la eficacia de los modelos farmacológicos basados en MPTP, 6-OHDA, rotenona y paraquat en el estudio de la EP en el PC. Se evaluará la calidad de los estudios que utilizan estos modelos, se identificarán las ventajas y limitaciones de cada modelo y se discutirá su relevancia para su uso en la investigación de la EP. El objetivo de esta revisión es proporcionar una evaluación exhaustiva de los modelos disponibles y compararlos con la información presente en la literatura científica previa. Las preguntas de investigación que plantea la presente revisión son las siguientes:

1. ¿Cuál es la eficacia, ventajas y limitaciones de los modelos farmacológicos basados en MPTP, 6-OHDA, rotenona y paraquat en el estudio de la EP en el PC en comparación entre sí y con la literatura científica previa?
2. ¿Qué información relevante se ha discutido en la literatura científica previa sobre el uso de estos modelos farmacológicos para el estudio de la EP en el PC?

6. METODOLOGÍA

Para la adecuada realización de la presente revisión sistemática se ha realizado un análisis recomendaciones establecidas en la declaración PRISMA 2020 (ANEXO 1), con la finalidad de garantizar su validez y asegurar la fiabilidad de los hallazgos.

6.1. CRITERIOS DE ELEGIBILIDAD

Para llevar a cabo una revisión sistemática rigurosa, se establecieron unos criterios claros de elegibilidad con el fin de incluir o excluir los estudios relevantes y garantizar la calidad y la integridad de la revisión. Se muestran en la **Tabla 1**.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
Publicaciones referidas al modelo de PC adulto.	Artículos de revisión.
Publicaciones que hablen de la EP y los modelos farmacológicos seleccionados para la revisión sistemática.	Publicaciones que hablen sobre factores protectores o posibles fármacos para el tratamiento del Parkinson estudiados en modelos farmacológicos del PC.
Artículos en inglés o español.	Artículo no accesible.
	Artículos que hablen únicamente de modelos genéticos.

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión.

6.2. FUENTES DE INFORMACIÓN

Durante la elaboración de esta revisión sistemática se realizaron búsquedas en varias bases de datos, siendo las elegidas Pubmed y Scopus, consiguiendo así abarcar los objetivos con estudios relevantes en el campo de la salud.

6.3. ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA

Para la realización de la búsqueda en las bases de datos anteriormente citadas se siguió una estrategia de búsqueda caracterizada por el uso de ecuaciones de búsqueda y filtros basados en los criterios exclusión; se realizó entre noviembre de 2022 y febrero de 2023.

La ecuación de búsqueda (reflejada en la **Tabla 2**) se construyó a partir de términos MeSH (Medical Subject Headings) y palabras clave relacionadas con la EP (“**Parkinson Disease [Mesh]**”), el PC (“**Zebrafish [Mesh]**”) y las neurotoxinas utilizadas en los estudios (“**1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine [Mesh]**”, “**oxidopamine [Mesh]**”, “**paraquat [Mesh]**”, “**rotenone [Mesh]**”). Se utilizó el operador booleano “AND” para asociar los términos de forma que los resultados contuvieran los términos de búsqueda especificados. Los filtros aplicados se centraron en excluir de la búsqueda las revisiones sistemáticas.

BASE DE DATOS	ECUACIÓN DE BÚSQUEDA	RESULTADOS SIN CRITERIOS DE INCLUSIÓN	RESULTADOS CON CRITERIOS DE INCLUSIÓN
Pubmed	("Parkinson Disease"[Mesh]) AND "Zebrafish"[Mesh]	104	3
Pubmed	("Zebrafish"[Mesh]) AND "1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine"[Mesh]	33	3
Pubmed	("Zebrafish"[Mesh]) AND "Oxidopamine"[Mesh]	36	2
Pubmed	("Zebrafish"[Mesh]) AND "Paraquat"[Mesh]	20	2
Pubmed	("Zebrafish"[Mesh]) AND "Rotenone"[Mesh]	28	2
Scopus	(TITLE-ABS-KEY (zebrafish)) AND (TITLE-ABS-KEY (parkinson AND disease))	441	6
Scopus	(TITLE-ABS-KEY (zebrafish) AND TITLE-ABS-KEY (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine))	58	4
Scopus	(TITLE-ABS-KEY (zebrafish) AND TITLE-ABS-KEY (oxidopamine))	66	2
Scopus	(TITLE-ABS-KEY (zebrafish) AND TITLE-ABS-KEY (paraquat))	60	3
Scopus	(TITLE-ABS-KEY (zebrafish) AND TITLE-ABS-KEY (rotenone))	98	2

Tabla 2. Ecuaciones de búsqueda y resultados.

6.4. PROCESO DE SELECCIÓN DE LOS ESTUDIOS

Una vez realizada la búsqueda y la obtención de los artículos con las ecuaciones anteriormente descritas se procedió a una lectura de los estudios para

determinar si cumplían los criterios de inclusión o exclusión. Tras esta lectura se eliminaron los artículos que no se adaptaban a los criterios fijados. Posteriormente se eliminaron los artículos duplicados y se analizó el texto completo de los resultantes. El proceso de selección se ve reflejado en el diagrama de flujo (**Figura 3**, apartado 6.1. Selección de los estudios).

6.5. PROCESO DE EXTRACCIÓN DE LOS DATOS

Tras aplicar los criterios fijados, se seleccionaron 11 artículos relevantes para su análisis y extracción de evidencia. Para organizar y recopilar los datos individuales de cada estudio, se elaboró una tabla estandarizada (**ANEXO 5**) con los siguientes ítems: título, base de datos, diseño del estudio, exposición/intervención, objetivo, variables, calidad de la evidencia y resultados. Para evaluar la calidad metodológica de cada estudio de investigación con modelos animales se utilizó el *CAMARADES 10-ítem checklist* (**ANEXO 2**).

6.6. EVALUACIÓN DEL RIESGO DE SESGO DE LOS ESTUDIOS INDIVIDUALES

Para la evaluación del riesgo de sesgo se utilizó la herramienta SYRCLE's RoB (**ANEXO 3**), diseñada específicamente para evaluar estudios de investigación animal. Se confeccionó una tabla a partir de estos criterios que se encuentra en el **ANEXO 4**.

6.7. ANÁLISIS Y SÍNTESIS

Tras efectuar la lectura de los estudios escogidos se presentaron los resultados de cada uno de los estudios seleccionados de forma concisa, haciendo énfasis en los principales hallazgos y conclusiones, destacando tanto los efectos positivos como los negativos de las intervenciones realizadas. Finalmente, se procedió a realizar una síntesis de los resultados obtenidos a fin de responder las preguntas de investigación planteadas en la introducción de la presente revisión.

7. RESULTADOS

7.1. SELECCIÓN DE LOS ESTUDIOS

Para llevar a cabo la selección de los estudios se realizó una primera búsqueda en Pubmed y Scopus con las ecuaciones de búsqueda anteriormente descritas, resultando en un total de 944 artículos. Posteriormente se aplicaron los criterios de inclusión y se procedió a la lectura de los abstract para descartar aquellos estudios que no se adaptaran a la pregunta de investigación o cumplieran algún criterio de exclusión, dando como resultado un total de 29 artículos. Seguidamente, se procedió a eliminar los artículos duplicados para finalizar con un total de 11 artículos.

El proceso de selección queda representado en la **Figura 3**.

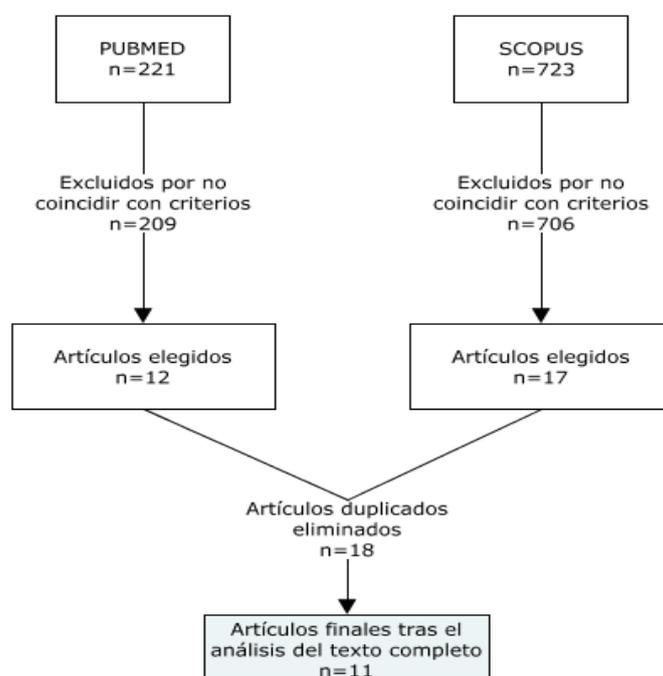


Figura 3. Diagrama de flujo del proceso de selección de los estudios.

7.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS ESTUDIOS

Una vez llevada a cabo la selección de los 11 artículos finales, se realizó una lectura crítica y una extracción de los datos más relevantes de cada artículo, siguiendo los ítems descritos en el apartado 5.5. Proceso de extracción de datos. Se confeccionó una tabla que se encuentra en el **ANEXO 5**, donde se presenta una estructura organizada para facilitar la comprensión de la información recogida. Además, se construyó una tabla en la que se explican resumidamente

los ensayos utilizados en cada estudio (**ANEXO 6**), para facilitar su entendimiento.

7.3. RIESGO DE SESGO DE LOS ESTUDIOS INDIVIDUALES

En la presente revisión sistemática se evaluó el riesgo de sesgo en los estudios individuales utilizando la herramienta SYRCLE's RoB (**ANEXO 3**) para evaluar el sesgo en los estudios preclínicos en animales.

El riesgo de sesgo de cada estudio se clasifica en 3 categorías: bajo riesgo de sesgo (verde), alto riesgo de sesgo (rojo) y riesgo de sesgo incierto (naranja). Los resultados de la evaluación del riesgo de sesgo se presentan en la tabla del **ANEXO 4**.

7.4. RESULTADO DE LOS ESTUDIOS INDIVIDUALES

A) Y. Vijayanathan et al. (2017).

En este estudio la administración de 6-OHDA intracerebroventricular (i.c.v.) produce una reducción significativa de las neuronas dopaminérgicas en el área preóptica, el tubérculo posterior y el hipotálamo, pero también en el bulbo olfatorio y en el telencéfalo del PC. Tras la administración de 6-OHDA, la distancia recorrida disminuyó en un 16% y la velocidad media en un 12% comparada con PC intacto. A los 30 días tras la administración de 6-OHDA se recuperaron el 100% de las neuronas dopaminérgicas lesionadas en el área preóptica, el tubérculo posterior y el hipotálamo.

B) N. Hamzah et al. (2021).

La administración periférica de 6-OHDA causa una reducción global de los niveles de dopamina en el sistema nervioso, mientras que la administración en el líquido cefalorraquídeo causa una ablación de las neuronas dopaminérgicas del sistema nervioso central en general. En cambio, la inyección intracerebroventricular de 6-OHDA induce ablación selectiva de neuronas dopaminérgicas en el área ventral del diencefalo del PC (equivalente a la sustancia nigra pars compacta en los humanos). Estos resultados se explican debido a que la 6-OHDA no puede cruzar la barrera hematoencefálica.

Tras la administración i.c.v. de 0'5µL de 6-OHDA se observó una ablación de más del 85% de las neuronas dopaminérgicas en el diencefalo del PC, una

disminución en la velocidad y en la distancia recorrida del 45% respecto a los PC no lesionados y una recuperación total de las neuronas lesionadas a los 30 días de la inyección de la neurotoxina.

C) H. Dong et al. (2022).

El presente estudio demostró que la exposición transitoria de 1 μ M de MPTP durante un periodo sensible en el desarrollo temprano del PC provocó alteraciones en la microbiota, hipoactividad e interacciones sociales reducidas en los PC machos adultos que persisten en etapas tardías de la vida (6 meses post-fertilización). El MPTP se administró a las larvas de PC a través del agua de cría durante una ventana de desarrollo sensible de 48-96 horas después de la fertilización.

A continuación, los machos tratados con MPTP mostraron una tendencia a la hipoactividad durante los periodos de luz en el test de locomoción caracterizada por la reducción de rachas de movimiento a altas velocidades (>8cm/s). El estudio reveló que los cambios inducidos por el MPTP son permanentes y el hecho de que solo los machos se viesen afectados podría ser debido a las diferencias dependientes del sexo en el sistema dopaminérgico nigro-estriatal sumado al efecto protector estrogénico.

En cuanto al comportamiento social las hembras tratadas con MPTP mostraron un incremento del tiempo en la zona del espejo, mientras que los machos mostraron una disminución de las veces que pasaron por delante del espejo.

Para la agrupación en bancos de peces, no se observaron diferencias entre los PC tratados con MPTP y con el control a la hora de analizar los siguientes parámetros: la distancia al vecino más cercano, la distancia interindividual, la polarización y la velocidad de nado. En el test de preferencia social los PC machos tratados con MPTP estuvieron menos tiempo en la zona proximal a otros PC en el periodo con luz. Aun así, este porcentaje de tiempo se distribuyó de forma bimodal, revelando que parte de los machos no mostraron ningún déficit en el test de preferencia social, sugiriendo susceptibilidad interindividual a la exposición de MPTP.

Finalmente, en la microbiota se produjo una reducción significativa en la diversidad y la uniformidad en las hembras tratadas con MPTP. Además,

aumentó la susceptibilidad a la colonización por *Vibrio spp.* en algunas muestras individuales.

D) M. Kalyn et al (2021).

En este estudio, en primer lugar, tras la exposición a MPTP en los PC (una inyección diaria durante cuatro días consecutivos) se observó una disminución de las neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio, del telencéfalo y del núcleo pretectal periventricular. El 65% de las mitocondrias analizadas en el PC + MPTP estaban fragmentadas, en comparación al 8% del grupo control, indicando una disfunción en el grupo MPTP. También se extrajo el RNA del cerebro de los PC, observándose una disminución de la expresión de los genes *dat* y *th1* en un 40% y 20% respectivamente en los PC + MPTP frente al grupo control, mientras que se observó un aumento de la expresión de *sox2* y *nestin* en un 71% y 35% respectivamente, sugiriendo una activación regenerativa inmediata después de la quimio-ablación dopaminérgica con MPTP. La expresión del gen *shha* también aumentó en un 29%, siendo este gen identificado como un regulador clave en la neurogénesis embrionaria dopaminérgica del PC y otros vertebrados.

Seguidamente, en el ensayo de locomoción, la distancia total recorrida disminuyó en el grupo PC + MPTP en un 46'7% y la velocidad media en un 47% respecto al control. Inversamente, los periodos de inmovilidad aumentaron en un 51%.

Finalmente, en el ensayo de estímulo repulsivo con cadaverina el grupo PC + MPTP no desarrolló una respuesta rápida como la observada en el grupo control, por lo que se deduce que la pérdida de neuronas dopaminérgicas en el bulbo olfatorio se traduce en una discapacidad funcional frente a un estímulo olfativo.

E) N. Sarath Babu et al. (2016).

En este estudio, en los PC adulto tratados con MPTP (M1 y M2, recibiendo 1 o 2 dosis de 50 µg respectivamente, observándose los resultados 12h tras la administración) disminuyó el número de veces que cruzaron el tanque de agua en un 40% el grupo M1 y en un 75% el grupo M2 respecto al grupo control. La duración de los periodos de inmovilidad fue de 11 segundos en M1 (durante un

total de 5 periodos de inmovilidad) y de 70 segundos en M2 (durante un total de 3 periodos de inmovilidad). La distancia total recorrida en el grupo M1 disminuyó en un 25% y en M2 disminuyó en un 68% respecto al grupo control.

Además, en los grupos M1 y M2 se ensayó el efecto de 1 dosis y 2 dosis de Deprenyl (Selegilina). El número de veces que cruzaron el tanque de agua aumentó significativamente en el grupo M1 tras 1 dosis y tras 2 dosis de Deprenyl. También disminuyeron los periodos de inmovilidad y la duración de estos en el grupo M1. En el grupo M2 la recuperación de un fenotipo normal después de la exposición a MPTP fue poco significativa después del tratamiento con Deprenyl.

En cuanto al análisis proteómico, se identificaron cambios en la regulación de ciertas proteínas involucradas en distintas rutas neurológicas respecto al control. En el análisis Western Blot se encontró un aumento de la proteína PARK8 en los grupos de PC M1 y M2 respecto al control.

F) K. Razali et al. (2022).

Los estudios realizados en el PC, frecuentemente observan el efecto del MPTP 24h después de la inyección. En este estudio se evaluó los efectos de la inyección intraperitoneal (i.p.) de 200 µg/g de peso de MPTP en múltiples ocasiones (0h, 24h y 96h después de la inyección).

En los PC + MPTP la velocidad de movimiento disminuyó en un 30% respecto al control a las 24h y se mantuvo baja a las 96h. En este grupo, los PC nadaron distancias un 30% más cortas respecto al control a las 24h y a las 96h de la administración del MPTP. Los periodos de inmovilidad fueron de más de 2 minutos en el grupo PC + MPTP a las 24h y 96h (alternando entre inmovilidad y movimiento más frecuentemente a las 24h que a las 96h, permaneciendo predominante inmóviles a las 96h).

En cuanto al patrón exploratorio de movimiento (el tanque de agua se dividió en 2 zonas imaginarias, la zona interna IN y la zona externa OUT) se comparó el tiempo que pasaron los PC + MPTP y los PC control en la zona IN y la zona OUT, viendo que pasaron la mitad del tiempo en la zona IN y la otra mitad cerca a la pared del tanque, aunque los PC + MPTP cambiaron en menos ocasiones de la zona IN a la zona OUT que los PC control, indicando que preferían nadar más cerca de su posición inicial antes que explorar sus alrededores.

El ángulo de giro es un aspecto importante en la evaluación del comportamiento de los PC, ya que se basa en la contracción muscular de la cola. En los PC + MPTP los ángulos de giro fueron mayores a las 24h y 96h tras la inyección respecto a las 0h tras la inyección y respecto al control. Además, el cambio en la dirección del movimiento de los PC+MPTP en relación con la distancia recorrida fue 3 veces mayor a las 24h y 96h de la inyección que a las 0h. Estos comportamientos podrían ser análogos a la incoordinación vista en los humanos con EP a la hora de ejecutar movimientos voluntarios.

Mientras los PC control mostraron nado continuo, los PC+MPTP presentaron fenotipos de nado anormales indicando incoordinación.

G) A. Bashirzade et al. (2022).

Los pacientes que se encuentran en etapas tardías de la EP a menudo sufren pérdidas en la memoria de trabajo espacial y no espacial, mientras que los pacientes en las etapas más tempranas de la enfermedad muestran falta de atención, disfunción ejecutiva e inflexibilidad cognitiva. El impulso innato para la alternancia de movimientos es una estrategia exploratoria importante en diferentes especies para la que se requiere una memoria de trabajo competente. En este estudio se caracterizaron los déficits cognitivos de la EP en el PC adulto evaluando su memoria de trabajo espacial y su comportamiento de alternancia espontánea (AE).

En este estudio, los PC tratados con 200 µg MPTP mostraron (a las 6h y 24h de la administración de la toxina) una AE reducida en el ensayo Y-Maze respecto al control, aunque las tasas de AE no se acompañaron de déficits locomotores. Estos resultados indican una disminución de las capacidades cognitivas en los PC tratados con MPTP, detectadas sin la necesidad de observar déficits locomotores manifiestos.

En el *Inhibitory Avoidance Test* (IAT) los PC control mostraron una latencia mayor para entrar a la zona profunda del tanque de agua el segundo día del ensayo (tras el estímulo agresivo el primer día) respecto al primer día, indicando un aprendizaje del miedo inalterado. En los PC + 200 µg MPTP no se observaron diferencias respecto al grupo control en este ensayo.

H) M. Nunes et al. (2016).

El grupo tratado con Paraquat (PQ) con una inyección intraperitoneal de 20 mg/kg (siendo el volumen inyectado de 10 μ L) cada 3 días durante un total de 16 días mostró (respecto al control) a las 24h de la administración de la toxina una disminución significativa del tiempo que pasaron en el fondo del tanque de agua y un tiempo de latencia más corto para entrar en la parte más superficial en el *Novel Tank Test*. En cambio, no se alteró la distancia total recorrida, el ángulo de giro absoluto y las transiciones a la superficie del tanque de los PC en comparación con el control, así como tampoco hubo cambios significativos en el número y duración de episodios de inmovilidad y de movimientos erráticos.

Los PC + PQ mostraron (frente al grupo control) una disminución en el número y duración de los episodios de evaluación de riesgo en el ensayo de luz-oscuridad, así como un aumento de la conducta agonista en la prueba de agresión inducida por espejo y una mayor parte del tiempo en la sección A1 del espejo (indicando preferencia por la proximidad al “oponente”).

El PQ provocó daño cerebral al disminuir la viabilidad mitocondrial.

En lo referente al sistema de defensa antioxidante en las muestras de tejido cerebral, el PQ aumentó la catalasa, la glutatión peroxidasa y el contenido de sulfhidrilo no proteico, pero no modificó la formación de especies reactivas de oxígeno y disminuyó la peroxidación lipídica.

I) J. Bortolotto (2014).

En este estudio los PC adultos recibieron una inyección intraperitoneal de 10 mg/kg (PQ10) o 20 mg/kg (PQ20) cada 3 días hasta recibir un total de 6 inyecciones.

La administración de PQ en los PC provocó una disminución de la distancia recorrida (PQ10 a partir del día 10 y PQ20 desde el primer día) y del ángulo de giro absoluto a las 24h respecto al grupo control (PQ10 solo el día 10 mientras que PQ20 desde el primer día). La velocidad media del grupo PQ10 disminuyó a partir del día 10 (siendo muy similar a la del grupo control durante los primeros días), mientras que la del grupo PQ20 disminuyó desde el primer día en comparación con el grupo control. Estos resultados sugieren un efecto dosis-dependiente en la iniciación y el mantenimiento del movimiento en los PC crónicamente tratados con PQ.

En el ensayo Y-Maze, ambos grupos tratados con PQ mostraron una alteración de la adquisición y consolidación de la memoria espacial. Aun así, los grupos tratados con PQ no demostraron en este ensayo ningún déficit locomotor ni disminución en la velocidad media respecto al grupo control.

Los niveles de dopamina aumentaron mientras que los de DOPAC disminuyeron en el cerebro de los PC después la exposición a PQ. Estos resultados sugieren que la administración de PQ reduce el metabolismo de dopamina en el cerebro del PC.

La expresión de DAT disminuyó en el grupo PQ10 mientras que no hubo cambio en el grupo PQ20. La proteína DAT se encarga de regular los niveles de dopamina extracelular introduciéndola activamente dentro de la neurona.

La cantidad de TH no se modificó significativamente en comparación con el grupo control.

J) P. Hettiarachchi et al. (2022).

En este estudio, 3 µg/L de rotenona (ROT) fue administrada durante 4 semanas al grupo PC + ROT, disuelta en el agua de su tanque. A través de la voltamperometría cíclica de barrido rápido (FSCV por sus siglas en inglés), se midió la liberación de dopamina en los cerebros de los PC + ROT resultando ser un 30% de la de los grupos control y DMSO, sin existir diferencias entre sexos. La recaptación de dopamina en la FSCV también disminuyó en el grupo ROT respecto al control y DMSO.

En el laberinto de aprendizaje latente, los PC del grupo control y DMSO prefirieron tomar el camino por el túnel que, según recordaban de su entrenamiento previo, no estaba obstruido, mientras que los PC + ROT pasaron más tiempo recorriendo la superficie completa del laberinto. Los PC + ROT tardaron un 50% más en alcanzar la recompensa en el laberinto que el grupo control y DMSO (eligiendo el camino incorrecto). Estos hallazgos sugieren una alteración en el aprendizaje latente, viéndose afectada la capacidad para la adquisición de memoria y su consolidación. El aprendizaje latente se basa en la retención de información de forma pasiva sin un incentivo: el sujeto adquiere conocimientos o habilidades a través de la observación y la experiencia, pero no los demuestra hasta que se le presenta un incentivo o una situación en la que puede aplicar lo que ha aprendido.

Los PC + ROT pasaron menos tiempo en la zona de la recompensa (en la que se encontraban previamente 5 PC a modo de estímulo) en comparación con los grupos control, posiblemente reflejando una tendencia disminuida a agruparse. Además, los PC + ROT mostraron una actividad locomotora disminuida, nadaron distancias más cortas y con una velocidad media y aceleración menor que el grupo control y DMSO.

K) Y. Wang et al. (2016).

Los PC tratados en este estudio durante 4 semanas con 2 µg/L ROT mostraron una reducción del 70% en el tiempo que pasaron nadando y en la distancia recorrida a altas velocidades (>20 mm/s) que el grupo control, indicando un déficit motor producido por la toxina.

En el ensayo de luz-oscuridad, los PC+ROT mostraron tiempos de latencia más largos a la hora de entrar en la zona oscura. Estos hallazgos sugieren unas conductas ansioso-depresivas, inducidas por la administración de ROT.

La disfunción olfatoria ocurre varios años antes del inicio de los síntomas motores en personas con EP, afectando al 90% de los pacientes. En el PC puede ser evaluada con la preferencia por los aminoácidos. En este estudio los PC + ROT mostraron disfunción olfatoria al no mostrar preferencia por los aminoácidos liberados en el tanque de agua al comparar sus patrones de nado con los de los PC control.

También se observó que la expresión de TH disminuyó en un 50% en los PC + ROT respecto al grupo control, asociándose a una disminución de los niveles de dopamina en el cerebro de estos peces.

En el presente estudio se analizó la expresión de genes relacionados con la EP en los PC: la expresión de *snca*, *parkina* y *pink1* fue similar en ambos grupos, mientras que disminuyó la expresión de *dj-1* en un 60% y aumentó la expresión de *lrrk2* en los PC + ROT respecto al grupo control.

7.5. SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS

Una vez realizada la extracción de datos de los estudios de forma individual, se procede a la síntesis de la información con la finalidad de analizar los resultados con mayor claridad. Se han analizado un total de 11 artículos, entre los que se han estudiado 4 neurotoxinas distintas, por lo que se hablará conjuntamente de

los artículos que estudien la misma neurotoxina con la finalidad de comparar su evidencia.

Respecto a la **6-OHDA**, Vijayanathan et al. observaron una reducción significativa de las **ND** en diferentes áreas del cerebro del PC, afectando también a la capacidad **motora** de los PC respecto al grupo control, viéndose que a los 30 días de la administración de la neurotoxina se habían **recuperado** el 100% de las neuronas lesionadas en 3 áreas cerebrales.

Los resultados de Hamzah et al. son congruentes con los de Vijayanathan et al., mostrando una ablación de **ND**, una afectación de la capacidad **motora** y una **recuperación** posterior de las ND lesionadas.

En cuanto a los artículos que estudiaron el **MPTP**, Dong et al. observaron que la exposición transitoria de 1 μ M de MPTP durante las 48-96h post-fertilización provocó alteraciones en la **microbiota**, **hipoactividad** e **interacciones sociales** reducidas en los PC machos adultos que persistieron en **etapas tardías** de la vida (6 meses post-fertilización).

En Kalyn et al. realizaron una administración i.c.v. de 25 μ M de MPTP, resultando en muerte de ND produciendo una afectación del fenotipo **motor** y **sensorial**, al igual que una **disfunción mitocondrial**.

Los hallazgos de Babu et al. se resumen en la alteración del fenotipo **motor**, la **hipoactividad** y los cambios en la regulación de algunas **proteínas** involucradas en ciertas rutas neurológicas tras 12h de la administración del MPTP i.p. Los efectos fueron más graves en los grupos en los que se administraron 2 dosis de MPTP frente a los que solo se administró 1.

En Razali et al. la administración de MPTP redujo la actividad **motora**, alteró la complejidad de los **patrones de movimiento** e indujo fenotipos de nado anormales entre las 24h y las 96h tras la inyección intraperitoneal.

Finalmente, en Bashirzade et al. observaron una disminución de las capacidades **cognitivas** y de la **memoria** tras la administración del MPTP, que no se acompañaron de déficits motores.

En referencia a los artículos que analizaron el **PQ**, en Nunes et al. la administración repetida de PQ en PC adultos reveló un incremento de la

agresividad y una disminución de las conductas defensivas, alteraciones que se pueden relacionar con desordenes psiquiátricos y enfermedades neurodegenerativas, mientras que no se alteraron las capacidades motoras.

En cambio, en Bortolotto et al., se produjo una afectación significativa de la **locomoción**, además de una disrupción de la **memoria espacial** sin alteraciones en la conducta social.

Por último, los efectos de la ROT se estudiaron en Hettiarachchi et al., donde se vio que disminuyó la **liberación** y la **recaptación** de **dopamina** y se produjo una alteración en la capacidad para la **locomoción** y el **aprendizaje**.

Los resultados son congruentes con lo observado en Wang et al., ya que en este estudio la administración de ROT provocó una disminución en los niveles de **dopamina**, una peor **función motora**, además de una modificación en la **expresión genética** y **déficits olfatorios**.

MODELO	SÍNTOMAS MOTORES	SÍNTOMAS NO MOTORES	OBSERVACIONES	REFERENCIAS
6-OHDA	Disminución de la distancia recorrida y velocidad media.		Disminución de ND. Los efectos deletéreos se recuperan.	Vijayanathan et al. Hamzah et al.
MPTP	Hipoactividad. Disminución de la distancia recorrida y velocidad media. Alteración en los patrones normales de nado.	Disminución de interacciones sociales. Alteraciones de la microbiota. Disfunción olfatoria. Alteraciones de aprendizaje y memoria.	Disminución ND. Daño mitocondrial. Cambios en expresión génica. Cambios en regulación proteica.	Dong et al. Kalyn et al. Babu et al. Razali et al. Bashirzade et al.
Paraquat	Disminución de la distancia recorrida y velocidad media.	Disminución de capacidades cognitivas. Disminución de memoria asociativa y espacial. Aumento de la agresividad.	Resultados variables entre estudios. Disminución del metabolismo de dopamina.	Nunes et al. Bortolotto et al.
Rotenona	Disminución de la distancia recorrida y velocidad media.	Alteración del aprendizaje latente. Disfunción olfatoria. Conductas ansioso-depresivas.	Disminución de liberación y recaptación dopamina. Cambios en expresión génica.	Hettiarachchi et al. Wang et al.

Tabla 3. Síntesis de los resultados.

8. DISCUSIÓN

En los últimos años el PC se ha utilizado ampliamente como modelo para el estudio de las enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la EP. En el presente trabajo, se revisan varios artículos sobre el PC como modelo farmacológico de la EP.

El modelo de PC con **6-OHDA** es útil para el estudio de los síntomas motores de la EP. La 6-OHDA no es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, por lo que su administración periférica produce una reducción global de los niveles de dopamina en todo el sistema nervioso (23). Para que los resultados sean representativos, la administración de la neurotoxina se debe realizar de forma i.c.v, de forma que la 6-OHDA produzca una ablación específica de las ND en el área ventral del diencéfalo del PC. Es importante mencionar que en Vijayanathan et al. (24) no se describe la administración i.c.v. de ninguna sustancia en el grupo control (denominado en el estudio como “intacto”) por lo que no se hace explícito si los resultados obtenidos se deben al efecto de la 6-OHDA o podrían deberse a la cirugía en sí. Debido a las capacidades regenerativas del PC, en el modelo con 6-OHDA se observa una recuperación de los efectos degenerativos de la neurotoxina, por lo que no sería adecuado para estudiar la naturaleza degenerativa progresiva de la EP. En cambio, sí podría ser útil para entender el proceso regenerativo de las neuronas dopaminérgicas como un potencial enfoque en el tratamiento de la EP. La neurogénesis dopaminérgica en el cerebro de los mamíferos adultos raramente se produce, por lo que el uso de este tipo de modelos hace complicado entender este mecanismo.

Respecto al **MPTP**, los artículos que estudiaron este modelo observaron resultados con una afectación común de las capacidades motoras excepto en Bashirzade et al. (25), en el que existe una discordancia respecto a los demás ya que no se presentaron déficits motores a pesar de utilizar unas dosis similares a la de Razali et al. (6) y de evaluar los resultados después de los mismos periodos de tiempo (24h) tras la administración de la neurotoxina.

Entre los demás artículos, los resultados obtenidos son congruentes con los objetivos planteados en cada estudio, aunque se observó una heterogeneidad significativa en cuanto a las dosis y los métodos de administración de la neurotoxina, pudiendo ser necesaria la realización de más ensayos con animales con dosis y métodos de administración para establecer una metodología estandarizada.

En los estudios que evaluaron el modelo del PC tras la administración de **PQ** se observaron resultados dispares a pesar de que en los PC la dosis de

administración de la neurotoxina i.p. fue muy similar. En Nunes et al. (12) se produjo una alteración en la conducta social de los PC sin mostrar una alteración del fenotipo motor, mientras que en Bortolotto et al. (13) sí que se produjo una alteración de las capacidades motoras sin una afectación de la conducta social. Estas discrepancias podrían estar explicadas, en parte, por las diferencias en el genotipo y/o en el uso aleatorio de ambos sexos en estos ensayos (7), aunque también existe la posibilidad de que los efectos neurotóxicos del PQ puedan tener una alta variabilidad.

En la literatura científica se ha descrito previamente que los fenotipos inducidos por la **ROT** en el PC son incongruentes. En una revisión sistemática previa (7) se concluyó que en un estudio no se encontraron cambios celulares ni comportamentales similares a la EP en PC adulto ni en larvas expuestas a rotenona (26). Por el contrario, Wang et al. (17) (también revisado en el presente trabajo) usaron las mismas concentraciones de pesticida, tiempos de exposición y ruta de administración pero observaron que los PC adultos tenían niveles de dopamina disminuidos, déficits en la función motora, comportamientos similares a ansiedad y depresión y disfunción olfatoria, justificándose las diferencias entre ambos artículos por los diferentes protocolos utilizados en la medición de los parámetros a evaluar (7). En cambio, en la presente revisión se compararon los resultados obtenidos en Wang et al. (17) y Hettiarachchi et al. (27), en los que se utilizaron dosis de ROT muy similares y el mismo método de administración en ambos estudios. Los resultados en lo referente a la liberación de dopamina y la capacidad motora fueron congruentes. En cambio en Hettiarachchi et al. (27) también se observó un empeoramiento en la capacidad de aprendizaje, pero no se estudió la expresión genética ni los déficits olfatorios como en Wang et al. (17) debido al diseño del estudio.

Durante el proceso de revisión de los artículos y su evaluación del riesgo de sesgo con la herramienta SYRCLE's RoB se calificaron, en la mayoría de estudios, muchos ítems como "riesgo incierto de sesgo", implicando que las características a evaluar en esos estudios no estaban explícitamente descritas, no se mencionaban o se podían intuir por el contexto del artículo sin llegar a confirmarse. Esta situación es congruente con la descrita en el documento oficial

de Hooijmans et al. (28), siendo la causa una pobre descripción de los detalles experimentales en el apartado de materiales y métodos en los ensayos con animales de experimentación. Por este motivo es importante la adopción e implementación de esta herramienta para facilitar y mejorar la evaluación de la evidencia en futuros estudios con animales, con el objetivo de que se traduzca en una mejora en la calidad de estos estudios.

Cabe destacar la presencia de determinadas limitaciones a la hora de desarrollar la presente revisión sistemática. La calidad de la revisión sistemática depende de la calidad metodológica y del sesgo de los estudios incluidos en la revisión. Gracias a las herramientas CAMARADES y SYRCLE's RoB se puede observar que algunos de los artículos utilizados no describieron una aleatorización del tratamiento o control en la metodología, al igual que tampoco se describió un ocultamiento de la asignación. También existió un riesgo incierto de sesgo por la no descripción de protocolos para generar un ciego a la hora de conocer el grupo de intervención de los animales utilizados en el experimento. Como se ha descrito anteriormente, esto se puede deber a la pobre descripción de los métodos y materiales y no necesariamente a una falta de estas características en los estudios.

Además, también están presentes otras limitaciones propias de una revisión sistemática, como por ejemplo el carácter retrospectivo del estudio o la dificultad para incluir todos los estudios existentes respecto a una pregunta de investigación concreta. Previamente al proceso de revisión, se identificaron numerosas publicaciones que abordaban los posibles factores protectores o fármacos para el tratamiento de la EP estudiados en modelos farmacológicos del PC. A pesar de que el hallazgo puede ser muy relevante para la comprensión de la enfermedad, resultó ser un gran desafío para el análisis de los resultados debido a la gran cantidad de información disponible, afectando esto a la extensión del trabajo y a su comprensión y asimilación.

9. CONCLUSIONES

El PC ha demostrado ser una excelente alternativa para su uso como modelo en el estudio de la EP. La generación de modelos animales de enfermedades sigue siendo un reto en la actualidad, pero al mismo tiempo es una de las herramientas

más importantes para el estudio de enfermedades y el desarrollo de fármacos y terapias. El PC es un modelo ideal para realizar estudios a gran escala con un mayor rendimiento, en comparación con otros modelos más complejos como las ratas, los ratones o los primates no humanos, permitiendo incluir un tamaño muestral mucho mayor y sin dejar de tener un sistema nervioso central vertebrado complejo, pero con un costo mucho menor y con una mayor facilidad de mantenimiento.

En la actualidad las neurotoxinas parkinsonianas (6-OHDA, MPTP, PQ y ROT) permiten realizar una modelización de la EP en el PC, cada una con unas características propias que las hacen más o menos adecuadas dependiendo de la pregunta de investigación que se plantee en el estudio, aunque también existen algunas limitaciones:

- Modelo con 6-OHDA: es útil para el estudio de los parámetros de función motora en el PC adulto y de la capacidad regenerativa de sus neuronas dopaminérgicas, pero no se ha utilizado para evaluar los aspectos conductuales (ansiedad, depresión, etc.) que también forman parte de la EP en el humano. Necesita de una administración i.c.v. para evaluar los efectos de la ablación dopaminérgica de la neurotoxina de forma selectiva.
- Modelo con MPTP: es útil para el estudio de la afectación del fenotipo motor y no motor de la EP tanto de forma aguda como en etapas tardías de la vida. También es válido para estudiar el daño mitocondrial, los cambios en la expresión génica y la regulación proteica tras la administración de la neurotoxina.
- Modelo con PQ: los estudios han abordado los efectos sobre las capacidades motoras, la conducta social, las capacidades cognitivas y la memoria asociativa y espacial, obteniéndose resultados heterogéneos, por lo que son necesarios más estudios al respecto para poder estandarizar un modelo con esta neurotoxina.
- Modelo con ROT: el modelo tiene capacidad para el estudio de alteraciones motoras y no motoras como la alteración del aprendizaje latente, la disfunción olfatoria o las conductas ansioso-depresivas, así

como los efectos en la liberación y la recaptación de la dopamina y cambios en la expresión génica.

Es importante destacar que la descripción de los detalles experimentales en el apartado de métodos y materiales en los ensayos con animales de experimentación es de suma importancia para la evaluación de la calidad metodológica y de la evaluación del riesgo de sesgo de los artículos. Actualmente, los artículos disponibles en lo referente al PC como modelo para la EP contienen descripciones con escasa información respecto a la generación de secuencias aleatorias para la asignación de grupos de intervención y de control, así como en lo referente a la ocultación de la asignación a los diferentes grupos o del ciego que se realizó para ocultar a los cuidadores y/o investigadores qué intervención recibió cada animal durante el experimento. Por este motivo es importante la adopción e implementación de las herramientas SYRCLE's RoB y CAMARADES para facilitar y mejorar la evaluación de la evidencia en futuros estudios con animales, con el objetivo de que se traduzca en una mejora en la calidad de estos estudios.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Balestrino R, Schapira AHV. Parkinson disease. Vol. 27, European Journal of Neurology. 2020.
2. Xi Y, Noble S, Ekker M. Modeling Neurodegeneration in Zebrafish. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2011;11(3):274-82.
3. Tran J, Anastacio H, Bardy C. Genetic predispositions of Parkinson's disease revealed in patient-derived brain cells. *NPJ Parkinsons Dis.* 2020;6(1):1-18.
4. Lugo-Trampe Á, Trujillo-Murillo KDC. Genética y la enfermedad de Parkinson: Revisión de actuali-dades. *Medicina (B Aires).* 2010;12(54):187-92.
5. Campdelacreu J. Enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer: factores de riesgo ambientales. *Neurología.* 2014;29(9):541-9.
6. Razali K, Mohd Nasir MH, Othman N, Doolaanea AA, Kumar J, Ibrahim WN, et al. Characterization of neurobehavioral pattern in a zebrafish 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced model: A 96-hour behavioral study. *PLoS One.* 2022;17(10 October):e0274844.
7. Vaz RL, Outeiro TF, Ferreira JJ. Zebrafish as an animal model for drug discovery in Parkinson's disease and other movement disorders: A systematic review. Vol. 9, *Frontiers in Neurology.* Frontiers Media S.A.; 2018.
8. Sarath Babu N, Murthy CLN, Kakara S, Sharma R, Brahmendra Swamy C V, Idris MM. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induced Parkinson's disease in zebrafish. *Proteomics.* mayo de 2016;16(9):1407-20.
9. Panula P, Chen YC, Priyadarshini M, Kudo H, Semenova S, Sundvik M, et al. The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiol Dis.* 2010;40(1):46-57.
10. Hernandez-Baltazar D, Zavala-Flores LM, Villanueva-Olivo A. El modelo de 6-hidroxidopamina y la fisiopatología parkinsoniana: nuevos hallazgos en un viejo modelo. Vol. 32, *Neurología.* Spanish Society of Neurology; 2017. p. 533-9.
11. Thiele SL, Warre R, Nash JE. Development of a unilaterally-lesioned 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease. *Journal of Visualized Experiments.* 2012;(60):1-10.
12. Nunes ME, Müller TE, Braga MM, Fontana BD, Quadros VA, Marins A, et al. Chronic Treatment with Paraquat Induces Brain Injury, Changes in Antioxidant Defenses System, and Modulates Behavioral Functions in Zebrafish. *Mol Neurobiol.* 2017;54(6):3925-34.
13. Bortolotto JW, Cognato GP, Christoff RR, Roesler LN, Leite CE, Kist LW, et al. Long-Term Exposure to Paraquat Alters Behavioral Parameters and Dopamine Levels in Adult Zebrafish (*Danio Rerio*). *Zebrafish.* 2014;11(2):142-53.
14. Czerniczyniec A, Karadayian AG, Bustamante J, Cutrera RA, Lores-Arnaiz S. Paraquat induces behavioral changes and cortical and striatal mitochondrial dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(7):1428-36.
15. Ossowska K, Wardas J, Kuter K, Nowak P, Dabrowska J, Bortel A, et al. Influence of paraquat on dopaminergic transporter in the rat brain. *Pharmacological Reports.* 2005;57(3):330-5.
16. Shimizu K, Matsubara K, Ohtaki K, Fujimaru S, Saito O, Shiono H. Paraquat induces long-lasting dopamine overflow through the excitotoxic pathway in the striatum of freely moving rats. *Brain Res.* 2003;976(2):243-52.
17. Wang Y, Liu W, Yang J, Wang F, Sima Y, Zhong Z min, et al. Parkinson's disease-like motor and non-motor symptoms in rotenone-treated zebrafish. *Neurotoxicology.* 2017;58:103-9.
18. Betarbet R, Sherer TB, Mackenzie G, Garcia-osuna M, Panov A V, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure produces pd symptoms Betarbet. *Nat Neurosci.* 2000;26:1301-6.

19. Watabe M, Nakaki T. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-elicited dopamine redistribution from vesicles to cytosol in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2007;323(2):499-507.
20. Ribeiro FM, Camargos ER da S, De Souza LC, Teixeira AL. Animal models of neurodegenerative diseases. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2013;35(SUPPL.2):82-91.
21. Bartel WP, Van Laar VS, Burton EA. Parkinson's disease [Internet]. *Behavioral and Neural Genetics of Zebrafish*. 2020. 377 – 412 p.
22. Horzmann KA, Freeman JL. Zebrafish get connected: Investigating neurotransmission targets and alterations in chemical toxicity. Vol. 4, *Toxics*. 2016.
23. Hamzah NM, Lim SM, Vijayanathan Y, Lim FT, Majeed ABA, Tan MP, et al. Locomotor Assessment of 6-Hydroxydopamine-induced Adult Zebrafish-based Parkinson's Disease Model. *J Vis Exp*. 2021;2021(178).
24. Vijayanathan Y, Lim FT, Lim SM, Long CM, Tan MP, Majeed ABA, et al. 6-OHDA-Lesioned Adult Zebrafish as a Useful Parkinson's Disease Model for Dopaminergic Neuroregeneration. *Neurotox Res*. 2017;32(3):496-508.
25. Bashirzade AAO, Cheresiz S V, Belova AS, Drobkov A V, Korotaeva AD, Azizi-Arani S, et al. MPTP-Treated Zebrafish Recapitulate 'Late-Stage' Parkinson's-like Cognitive Decline. *Toxics*. 2022;10(2).
26. Bretaud S, Lee S, Guo S. Sensitivity of zebrafish to environmental toxins implicated in Parkinson's disease. *Neurotoxicol Teratol*. noviembre de 2004;26(6):857-64.
27. Hettiarachchi P, Niyangoda SS, Jarosova R, Johnson MA. Dopamine Release Impairments Accompany Locomotor and Cognitive Deficiencies in Rotenone-Treated Parkinson's Disease Model Zebrafish. *Chem Res Toxicol*. 2022;35(11):1974-82.
28. Hooijmans CR, Rovers MM, De Vries RBM, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol*. 2014;14(1):1-9.

11. ANEXOS

ANEXO 1. Declaración PRISMA 2020. Lista de ítems a incluir en una revisión sistemática.

Tabla 1
Lista de verificación PRISMA 2020

Sección/tema	Ítem n.º	Ítem de la lista de verificación	Localización del ítem en la publicación
TÍTULO			
Título	1	Identifique la publicación como una revisión sistemática.	
RESUMEN			
Resumen estructurado	2	Vea la lista de verificación para resúmenes estructurados de la declaración PRISMA 2020 (tabla 2).	
INTRODUCCIÓN			
Justificación	3	Describa la justificación de la revisión en el contexto del conocimiento existente.	
Objetivos	4	Proporcione una declaración explícita de los objetivos o las preguntas que aborda la revisión.	
MÉTODOS			
Criterios de elegibilidad	5	Especifique los criterios de inclusión y exclusión de la revisión y cómo se agruparon los estudios para la síntesis.	
Fuentes de información	6	Especifique todas las bases de datos, registros, sitios web, organizaciones, listas de referencias y otros recursos de búsqueda o consulta para identificar los estudios. Especifique la fecha en la que cada recurso se buscó o consultó por última vez.	
Estrategia de búsqueda	7	Presente las estrategias de búsqueda completas de todas las bases de datos, registros y sitios web, incluyendo cualquier filtro y los límites utilizados.	
Proceso de selección de los estudios	8	Especifique los métodos utilizados para decidir si un estudio cumple con los criterios de inclusión de la revisión, incluyendo cuántos autores de la revisión cribaron cada registro y cada publicación recuperada, si trabajaron de manera independiente y, si procede, los detalles de las herramientas de automatización utilizadas en el proceso.	
Proceso de extracción de los datos	9	Indique los métodos utilizados para extraer los datos de los informes o publicaciones, incluyendo cuántos revisores recopilaron datos de cada publicación, si trabajaron de manera independiente, los procesos para obtener o confirmar los datos por parte de los investigadores del estudio y, si procede, los detalles de las herramientas de automatización utilizadas en el proceso.	
Lista de los datos	10a	Enumere y defina todos los desenlaces para los que se buscaron los datos. Especifique si se buscaron todos los resultados compatibles con cada dominio del desenlace (por ejemplo, para todas las escalas de medida, puntos temporales, análisis) y, de no ser así, los métodos utilizados para decidir los resultados que se debían recoger.	
	10b	Enumere y defina todas las demás variables para las que se buscaron datos (por ejemplo, características de los participantes y de la intervención, fuentes de financiación). Describa todos los supuestos formulados sobre cualquier información ausente (<i>missing</i>) o incierta.	
Evaluación del riesgo de sesgo de los estudios individuales	11	Especifique los métodos utilizados para evaluar el riesgo de sesgo de los estudios incluidos, incluyendo detalles de las herramientas utilizadas, cuántos autores de la revisión evaluaron cada estudio y si trabajaron de manera independiente y, si procede, los detalles de las herramientas de automatización utilizadas en el proceso.	
Medidas del efecto	12	Especifique, para cada desenlace, las medidas del efecto (por ejemplo, razón de riesgos, diferencia de medias) utilizadas en la síntesis o presentación de los resultados.	
Métodos de síntesis	13a	Describa el proceso utilizado para decidir qué estudios eran elegibles para cada síntesis (por ejemplo, tabulando las características de los estudios de intervención y comparándolas con los grupos previstos para cada síntesis (ítem n.º 5).	
	13b	Describa cualquier método requerido para preparar los datos para su presentación o síntesis, tales como el manejo de los datos perdidos en los estadísticos de resumen o las conversiones de datos.	
	13c	Describa los métodos utilizados para tabular o presentar visualmente los resultados de los estudios individuales y su síntesis.	
	13d	Describa los métodos utilizados para sintetizar los resultados y justifique sus elecciones. Si se ha realizado un metanálisis, describa los modelos, los métodos para identificar la presencia y el alcance de la heterogeneidad estadística, y los programas informáticos utilizados.	
	13e	Describa los métodos utilizados para explorar las posibles causas de heterogeneidad entre los resultados de los estudios (por ejemplo, análisis de subgrupos, metarregresión).	
	13f	Describa los análisis de sensibilidad que se hayan realizado para evaluar la robustez de los resultados de la síntesis.	

Evaluación del sesgo en la publicación	14	Describa los métodos utilizados para evaluar el riesgo de sesgo debido a resultados faltantes en una síntesis (derivados de los sesgos en las publicaciones).
Evaluación de la certeza de la evidencia	15	Describa los métodos utilizados para evaluar la certeza (o confianza) en el cuerpo de la evidencia para cada desenlace.
RESULTADOS		
Selección de los estudios	16a	Describa los resultados de los procesos de búsqueda y selección, desde el número de registros identificados en la búsqueda hasta el número de estudios incluidos en la revisión, idealmente utilizando un diagrama de flujo (ver figura 1).
	16b	Cite los estudios que aparentemente cumplían con los criterios de inclusión, pero que fueron excluidos, y explique por qué fueron excluidos.
Características de los estudios	17	Cite cada estudio incluido y presente sus características.
Riesgo de sesgo de los estudios individuales	18	Presente las evaluaciones del riesgo de sesgo para cada uno de los estudios incluidos.
Resultados de los estudios individuales	19	Presente, para todos los desenlaces y para cada estudio: a) los estadísticos de resumen para cada grupo (si procede) y b) la estimación del efecto y su precisión (por ejemplo, intervalo de credibilidad o de confianza), idealmente utilizando tablas estructuradas o gráficos.
Resultados de la síntesis	20a	Para cada síntesis, resume brevemente las características y el riesgo de sesgo entre los estudios contribuyentes.
	20b	Presente los resultados de todas las síntesis estadísticas realizadas. Si se ha realizado un metanálisis, presente para cada uno de ellos el estimador de resumen y su precisión (por ejemplo, intervalo de credibilidad o de confianza) y las medidas de heterogeneidad estadística. Si se comparan grupos, describa la dirección del efecto.
	20c	Presente los resultados de todas las investigaciones sobre las posibles causas de heterogeneidad entre los resultados de los estudios.
	20d	Presente los resultados de todos los análisis de sensibilidad realizados para evaluar la robustez de los resultados sintetizados.
Sesgos en la publicación	21	Presente las evaluaciones del riesgo de sesgo debido a resultados faltantes (derivados de los sesgos de en las publicaciones) para cada síntesis evaluada.
Certeza de la evidencia	22	Presente las evaluaciones de la certeza (o confianza) en el cuerpo de la evidencia para cada desenlace evaluado.
DISCUSIÓN		
Discusión	23a	Proporcione una interpretación general de los resultados en el contexto de otras evidencias.
	23b	Argumente las limitaciones de la evidencia incluida en la revisión.
	23c	Argumente las limitaciones de los procesos de revisión utilizados.
	23d	Argumente las implicaciones de los resultados para la práctica, las políticas y las futuras investigaciones.
OTRA INFORMACIÓN		
Registro y protocolo	24a	Proporcione la información del registro de la revisión, incluyendo el nombre y el número de registro, o declare que la revisión no ha sido registrada.
	24b	Indique dónde se puede acceder al protocolo, o declare que no se ha redactado ningún protocolo.
	24c	Describa y explique cualquier enmienda a la información proporcionada en el registro o en el protocolo.
Financiación	25	Describa las fuentes de apoyo financiero o no financiero para la revisión y el papel de los financiadores o patrocinadores en la revisión.
Conflicto de intereses	26	Declare los conflictos de intereses de los autores de la revisión.
Disponibilidad de datos, códigos y otros materiales	27	Especifique qué elementos de los que se indican a continuación están disponibles al público y dónde se pueden encontrar: plantillas de formularios de extracción de datos, datos extraídos de los estudios incluidos, datos utilizados para todos los análisis, código de análisis, cualquier otro material utilizado en la revisión.

ANEXO 2. Escala para la evaluación de la calidad metodológica CAMARADES.

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD METODOLÓGICA (CAMARADES)	Publicación en revista de revisión por pares	Declaración de control temperatura	Aleatorización del tratamiento o control	Ocultamiento de asignación	Ciego en la evaluación del resultado	Evitan anestésicos con marcadas propiedades intrínsecas	Uso de animales con hipertensión o diabetes	Cálculo del tamaño muestral	Declaración de cumplimiento de los requisitos reglamentarios	Declaración sobre posibles conflictos de interés	Total (sobre 10)
Y. Vijayanathan et al. (2017)											6
N. Hamzah et al. (2021)											6
H. Dong et al. (2022)											6
M. Kalyn et al (2021)											5
N. Sarath Babu et al. (2016)											6
K. Razali et al. (2022)											8
A. Bashirzade et al (2022)											8
M. Nunes et al. (2016)											7
J. Bortolotto et al. (2014)											6
P. Hettiarachchi et al. (2022)											6
Wang et al. (2016)											6

ANEXO 3. Herramienta SYRCLE'S RoB para la evaluación del riesgo de sesgo.

Table 2 SYRCLE's tool for assessing risk of bias

Item	Type of bias	Domain	Description of domain	Review authors judgment
1	Selection bias	Sequence generation	Describe the methods used, if any, to generate the allocation sequence in sufficient detail to allow an assessment whether it should produce comparable groups.	Was the allocation sequence adequately generated and applied? (*)
2	Selection bias	Baseline characteristics	Describe all the possible prognostic factors or animal characteristics, if any, that are compared in order to judge whether or not intervention and control groups were similar at the start of the experiment.	Were the groups similar at baseline or were they adjusted for confounders in the analysis?
3	Selection bias	Allocation concealment	Describe the method used to conceal the allocation sequence in sufficient detail to determine whether intervention allocations could have been foreseen before or during enrolment.	Was the allocation adequately concealed? (*)
4	Performance bias	Random housing	Describe all measures used, if any, to house the animals randomly within the animal room.	Were the animals randomly housed during the experiment?
5	Performance bias	Blinding	Describe all measures used, if any, to blind trial caregivers and researchers from knowing which intervention each animal received. Provide any information relating to whether the intended blinding was effective.	Were the caregivers and/or investigators blinded from knowledge which intervention each animal received during the experiment?
6	Detection bias	Random outcome assessment	Describe whether or not animals were selected at random for outcome assessment, and which methods to select the animals, if any, were used.	Were animals selected at random for outcome assessment?
7	Detection bias	Blinding	Describe all measures used, if any, to blind outcome assessors from knowing which intervention each animal received. Provide any information relating to whether the intended blinding was effective.	Was the outcome assessor blinded?
8	Attrition bias	Incomplete outcome data	Describe the completeness of outcome data for each main outcome, including attrition and exclusions from the analysis. State whether attrition and exclusions were reported, the numbers in each intervention group (compared with total randomized animals), reasons for attrition or exclusions, and any re-inclusions in analyses for the review.	Were incomplete outcome data adequately addressed? (*)
9	Reporting bias	Selective outcome reporting	State how selective outcome reporting was examined and what was found.	Are reports of the study free of selective outcome reporting? (*)
10	Other	Other sources of bias	State any important concerns about bias not covered by other domains in the tool.	Was the study apparently free of other problems that could result in high risk of bias? (*)

*Items in agreement with the items in the Cochrane Risk of Bias tool.

ANEXO 4. Tabla con los ítems de la herramienta SYRCLE's Rob.

EVALUACIÓN DEL SESGO (SYRCLE)	Sesgo de selección			Sesgo de rendimiento		Sesgo de detección		Sesgo de desgaste		Libre de otras fuentes de sesgo
	Generación de secuencias	Características de la línea basal	Ocultación de la asignación	Asignación al azar	Ciego	Selección al azar para la evaluación de los resultados	Ciego	Evaluación de resultados incompletos	Libre de informe selectivo de resultados	
Vijayanathan et al. (2017)	Red	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Hamzah et al. (2021)	Red	Green	Yellow	Yellow	Red	Green	Green	Green	Green	Yellow
Dong et al. (2022)	Red	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green	Yellow
Kalyn et al (2021)	Red	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Yellow
Sarath Babu et al. (2016)	Red	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Razali et al. (2022)	Red	Green	Yellow	Green	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Bashirzade et al (2022)	Red	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Yellow
Nunes et al. (2016)	Red	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Bortolotto et al. (2014)	Red	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Hettiarachchi et al. (2022)	Red	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow
Wang et al. (2016)	Red	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Yellow

TÍTULO	BASE DE DATOS	DISEÑO DEL ESTUDIO	EXPOSICIÓN / INTERVENCIÓN	OBJETIVO	VARIABLES	CALIDAD DE LA EVIDENCIA	RESULTADOS
Vijayanathan et al. (2017) Alemania	Pubmed	Ensayo con animales de experimentación	PC adulto 2 grupos: PC adulto (n=4) + i.c.v. 25 mg/kg 6-OHDA PC intacto	Establecer un modelo estandarizado de la enfermedad de Parkinson en PC adulto inducido con inyección de 6-OHDA i.c.v. y validar la capacidad regenerativa de las neuronas dopaminérgicas del PC.	Velocidad media (cm/s), distancia recorrida (cm), células inmunorreactivas de tirosina hidroxilasa (marcador de neuronas dopaminérgicas), capacidad de regeneración de las neuronas dopaminérgicas.	CAMARADES 6/10	La administración de 6-OHDA muestra reducción significativa de las neuronas dopaminérgicas en el área preóptica, el tubérculo posterior y el hipotálamo, pero también en el bulbo olfatorio y el telencéfalo. Tras la administración de 6-OHDA, la distancia recorrida disminuyó un 16% y la velocidad media un 12% comparada con PC intactos. A los 30 días tras la administración de 6-OHDA se recuperaron el 100% de las neuronas dopaminérgicas lesionadas en área preóptica, tubérculo posterior e hipotálamo.
Hamzah et al. (2021) Reino Unido	Scopus	Ensayo con animales de experimentación	PC adulto 2 grupos: PC (n=6) + i.c.v. 0'5µL 6-OHDA PC control (solución salina i.c.v. al 0'9% p/v)	Evaluar los cambios en el movimiento del PC adulto tras una inyección i.c.v. de 6-OHDA generando un modelo de la EP y evaluar la capacidad regenerativa de las neuronas dopaminérgicas del PC.	Velocidad media (cm/s), distancia recorrida (cm), células inmunorreactivas de tirosina hidroxilasa, capacidad de regeneración de las neuronas dopaminérgicas	CAMARADES 6/10	La administración de 6-OHDA muestra ablación de más del 85% de las neuronas dopaminérgicas en el diencefalo del PC. Tras las administración de 6-OHDA, la velocidad media y la distancia recorrida disminuyó un 45% respecto a los PC no lesionados. A los 14 días tras la administración de 6-OHDA se recuperaron el 50% de las neuronas dopaminérgicas lesionadas y a los 30 días el 100%.

ANEXO 5. Tabla con las características principales de los artículos revisados.

<p>Dong et al. (2022) Países Bajos</p>	<p>Pubmed</p>	<p>Ensayo con animales de experimentación</p>	<p>Diseño factorial (sexo y 1 μM MPTP disuelto en el agua de cría de las larvas) en PC adulto.</p>	<p>Evaluar la toxicidad neuroconductual en PC adulto tras la exposición transitoria a MPTP durante el desarrollo temprano y evaluar como esta exposición afecta a la microbiota intestinal del PC adulto y larva.</p>	<p>Velocidad media (mm/s), porcentaje de tiempo activo, comportamiento social (test de contacto social, respuesta de espejo, agrupación y preferencia social), longitud y peso del cuerpo, peso del cerebro.</p>	<p>CAMARADES 6/10</p>	<p>Tras la exposición transitoria a MPTP: Los machos tratados con MPTP mostraron una tendencia a la hipoactividad durante los periodos de luz en el test de locomoción caracterizada por la reducción de rachas de movimiento a altas velocidades (>8cm/s). En cuanto al comportamiento social las hembras tratadas con MPTP mostraron un incremento del tiempo en la zona del espejo, mientras que los machos mostraron una disminución de las veces que pasaron por delante del espejo. Para la agrupación en bancos de peces, no se observaron diferencias entre los PC tratados con MPTP y con el control. En el test de preferencia social los PC machos tratados con MPTP disminuyeron el tiempo en la zona proximal a otros PC en el periodo con luz. En la microbiota se produjo una reducción significativa en la diversidad y la uniformidad en las hembras tratadas con MPTP. Además, aumentó la susceptibilidad a la colonización por <i>Vibrio spp.</i></p>
<p>Kalyn et al. (2021) Suiza</p>	<p>Scopus</p>	<p>Ensayo con animales de experimentación</p>	<p>PC adulto 2 grupos:</p>	<p>Investigar los efectos de la exposición al MPTP en PC</p>	<p>Neuronas dopaminérgicas, mitocondrias, distancia total</p>	<p>CAMARADES 5/10</p>	<p>En los PC + MPTP se observó una disminución de las neuronas dopaminérgicas del bulbo olfatorio, del telencéfalo y del núcleo preteccional</p>

			<p>PC + i.c.v. 25 μM MPTP</p> <p>PC control</p>	<p>adultos, específicamente en relación con la respuesta olfatoria y la función mitocondrial y neuronal.</p>	<p>recorrida, velocidad media, duración de periodos de tiempo de inmovilidad.</p>		<p>periventricular. Un mayor porcentaje de mitocondrias estaban fragmentadas en los PC + MPTP respecto al grupo control. Inversamente, un 4% de las mitocondrias en PC + MPTP estaban fusionadas respecto a un 39% en el grupo control, indicando una disfunción en el grupo MPTP. La expresión de los genes <i>daty th1</i> disminuyó, mientras que la de <i>sox2</i>, <i>nestin</i> y <i>shha</i> aumentó en el grupo PC + MPTP respecto al control. En el ensayo de locomoción, la distancia total recorrida y la velocidad media disminuyó en el grupo PC + MPTP respecto al control. Inversamente, los periodos de inmovilidad aumentaron. En el ensayo con cadaverina el grupo PC + MPTP no desarrolló una respuesta rápida como la observada en el grupo control.</p>
<p>Sarath Babu et al. (2016) Alemania</p>	<p>Pubmed</p>	<p>Ensayo con animales de experimentación</p>	<p>PC adulto en 3 grupos: PC (n=40) + control (solución salina i.p.) PC (n=40) + 1 dosis 50 μg MPTP i.p (M1). PC (n=40) + 2 dosis 50 μg MPTP i.p (M2).</p>	<p>Comprender la EP inducida por MPTP en el sistema nervioso del PC adulto mediante estudios conductuales, transcriptómicos y proteómicos.</p>	<p>Patrón de movimiento, nº de periodos de inmovilidad y su duración, distancia recorrida, cambios en la regulación proteica.</p>	<p>CAMARADES 6/10</p>	<p>En los PC tratados con MPTP disminuyó el número de veces que cruzaron el tanque de agua y la distancia recorrida, mientras que aumentaron los periodos de inmovilidad y la duración de estos periodos respecto al grupo control. En cuanto al análisis proteómico, se identificaron cambios en la regulación de ciertas proteínas involucradas en distintas rutas neurológicas.</p>

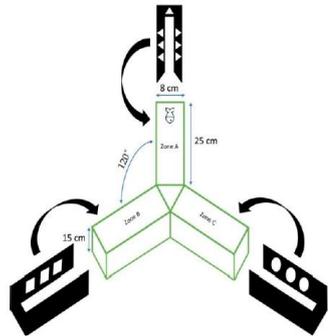
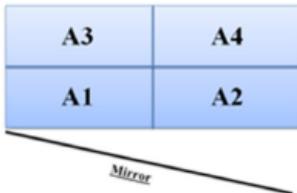
<p>Razali et al. (2022) EEUU California</p>	<p>Scopus</p>	<p>Ensayo con animales de experimentación</p>	<p>PC adulto en 2 grupos: PC (n=20) + 200 µg/g peso corporal MPTP i.p. PC (n=20) + control (suero salino i.p.)</p>	<p>Investigar los efectos del MPTP en el PC adulto para ayudar a tener un mejor entendimiento de la EP en los modelos animales.</p>	<p>Velocidad de movimiento (cm/s), distancia recorrida (cm), nº de periodos de inmovilidad y su duración, patrones de movimiento, peso corporal.</p>	<p>CAMARADES 8/10</p>	<p>En los PC + MPTP la velocidad de movimiento disminuyó respecto al control a las 24h y a las 96h. En este grupo, los PC nadaron distancias un 30% más cortas respecto al control a las 24h y a las 96h post-inyección i.p. de MPTP. Los periodos de inmovilidad fueron de más de 2 minutos en el grupo PC + MPTP a las 24h y 96h. En cuanto al patrón exploratorio de movimiento, los PC + MPTP cambiaron menos frecuentemente de la zona IN a la OUT respecto al control. Los PC + MPTP también mostraron patrones de movimiento alterados. No hubo cambios significativos en el peso de los PC.</p>
<p>Bashirzade et al. (2022) Suiza</p>	<p>Scopus</p>	<p>Ensayo con animales de experimentación</p>	<p>PC adulto en 4 grupos: PC + 50 µg MPTP i.p. PC + 100 µg MPTP i.p. PC + 200 µg MPTP i.p. PC control (suero salino i.p.)</p>	<p>Investigar los efectos de la exposición aguda al MPTP en el comportamiento cognitivo de los PC adultos y evaluar si se asemejan a los síntomas tardíos de la EP, estableciendo un modelo animal para el estudio de la EP.</p>	<p>% de alternancia espontánea (AE), distancia recorrida, velocidad media, velocidad máxima, latencia para entrar en la zona profunda.</p>	<p>CAMARADES 8/10</p>	<p>Los PC tratados con 200 µg MPTP mostraron una AE reducida en el ensayo Y-Maze respecto al control, aunque las tasas de AE no se acompañaron de déficits locomotores. El <i>Inhibitory Avoidance Test</i> (IAT) reveló una diferencia significativa en el tiempo de latencia para entrar a la zona profunda en el grupo control, reproduciendo un aprendizaje del miedo inalterado en los PC control; en cambio en los PC + 200 µg MPTP no se observaron diferencias respecto al grupo control en este ensayo.</p>

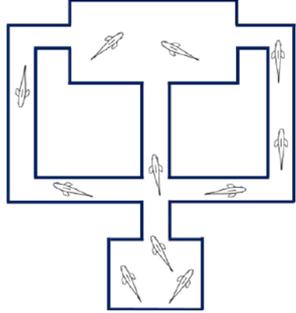
<p>Nunes et al. (2016) Alemania</p>	<p>Pubmed</p>	<p>Ensayo con animales de experimentación</p>	<p>PC adulto en dos grupos: PC + 20 mg/kg PQ i.p. PC control (solución salina i.p.)</p>	<p>Evaluar las acciones del Paraquat (PQ) en las funciones motoras y no motoras de los PC adultos y su influencia en los biomarcadores de estrés oxidativo en muestras de cerebro.</p>	<p>Número de entradas y tiempo en la zona profunda, latencia para llegar a la superficie, distancia recorrida, velocidad máxima, ángulo de giro absoluto, nº y duración de episodios de inmovilidad y de movimientos erráticos. Nº de entradas y tiempo en la zona iluminada, latencia para entrar en la zona oscura, nº de eventos de evaluación del riesgo. Nº y duración de ataques.</p>	<p>CAMARADES 7/10</p>	<p>El grupo tratado con PQ mostró (respecto al control) una disminución significativa del tiempo que pasaron en el fondo del tanque de agua y un tiempo de latencia más corto al entrar en la parte más superficial en el <i>Novel Tank Test</i>. Los PC + PQ mostraron (frente al grupo control) una disminución en el número y duración de los episodios de evaluación de riesgo en el ensayo de luz-oscuridad, así como un aumento de la conducta agonista en la prueba de agresión inducida por espejo. El PQ provocó daño cerebral al disminuir la viabilidad mitocondrial. Respecto al sistema de defensa antioxidante, el PQ aumentó la catalasa, la glutatión peroxidasa y el contenido de sulfhidrilo no proteico, no modificó la formación de ROS y disminuyó la peroxidación lipídica.</p>
<p>Bortolotto et al. (2014) EEUU Nueva York</p>	<p>Pubmed</p>	<p>Ensayo con animales de experimentación</p>	<p>PC adulto en tres grupos: PC + 10 mg/kg PQ i.p. PC + 20 mg/kg PQ i.p.</p>	<p>Evaluar el posible efecto neurotóxico de la administración sistémica de PQ en el perfil de locomoción, el aprendizaje y la memoria, la interacción social, la expresión de TH, los niveles de dopamina y DOPAC, y la</p>	<p>Locomoción, distancia recorrida, ángulo de giro absoluto, aprendizaje y memoria (Y-Maze), comportamiento e interacción social, expresión de tirosina hidroxilasa (TH), niveles de DOPAC (metabolito de la dopamina), expresión</p>	<p>CAMARADES 6/10</p>	<p>En este estudio, la administración de PQ en los PC provocó una disminución de la locomoción, la distancia recorrida y el ángulo de giro absoluto a las 24h respecto al grupo control. Por otra parte, no se observaron cambios en las conductas relacionadas con la ansiedad o las interacciones sociales en los grupos tratados con PQ respecto al control.</p>

			PC control (solución salina i.p.)	expresión del gen DAT en el PC adulto.	del gen transportador de la dopamina (DAT).		En el ensayo Y-Maze, ambos grupos tratados con PQ mostraron una alteración de la adquisición y consolidación de la memoria espacial. Los niveles de dopamina aumentaron mientras que los de DOPAC disminuyeron en el cerebro de los PC después la exposición a PQ. La expresión de DAT disminuyó en el grupo PQ10 mientras que no hubo cambio en el grupo PQ20. La cantidad de TH no se modificó significativamente en comparación con el grupo control.
Hettiarachchi et al. (2022) EEUU Nueva York	Scopus	Ensayo con animales de experimentación	PC adulto en 3 grupos (n=12 cada grupo): PC + 3µg/L ROT (solución de DMSO en agua del tanque) PC + DMSO PC control	Explicar los cambios a nivel neuroquímico y conductual inducidos por la administración de rotenona en el PC adulto y su utilidad en el estudio de otros modelos animales de enfermedad, así como el potencial del PC para su uso en el cribado de terapias farmacológicas.	Liberación y recaptación de dopamina, tiempo en el laberinto y en alcanzar la recompensa, actividad locomotora, distancia recorrida, velocidad media, aceleración.	CAMARADES 6/10	En este estudio la liberación de dopamina en los cerebros de los PC + ROT resultó ser un 30% de la del grupo control. La recaptación de dopamina también disminuyó en el grupo ROT respecto al control. En los ensayos de conducta, los PC + ROT tardaron un 50% más en alcanzar la recompensa en el laberinto que el grupo control. Además, los PC + ROT mostraron una actividad locomotora disminuida, nadaron distancias más cortas y con una velocidad media y aceleración menor que el grupo control.

<p>Wang et al. (2016) Países Bajos</p>	<p>Pubmed</p>	<p>Ensayo con animales de experimentación</p>	<p>PC adulto en 2 grupos: PC + 2µg/L ROT (disuelto en agua del acuario) PC control</p>	<p>Examinar los efectos de la ROT en el PC, evaluando la aparición de síntomas motores y no motores para determinar que el PC es un modelo apropiado para la EP.</p>	<p>Velocidad de movimiento, tiempo de latencia para entrar en la zona oscura, tiempo en la zona iluminada, nº cruces entre la zona oscura y la iluminada, preferencia olfatoria, niveles de dopamina en el cerebro.</p>	<p>CAMARADES 6/10</p>	<p>Los PC tratados durante 4 semanas con ROT pasaron menos tiempo nadando a altas velocidades que el grupo control, indicando un déficit motor. En el ensayo de luz-oscuridad, los PC + ROT mostraron tiempos de latencia más largos a la hora de entrar en la zona oscura reflejando conductas ansiosas y depresivas en comparación con el grupo control. Los PC + ROT también mostraron disfunción olfatoria. Estos hallazgos se asociaron con una disminución de los niveles de dopamina en los cerebros de los PC + ROT.</p>
--	---------------	---	---	--	---	--------------------------------	--

ANEXO 6. Características de los ensayos utilizados para evaluar al PC.

ENSAYO	Diseño	VARIABLES evaluadas	Descripción gráfica
Novel tank test	En un tanque de agua con paredes transparentes e iluminado desde la base, después de un tiempo de aclimatación, se graban los patrones de nado del pez desde una vista en planta (desde arriba) y/o horizontal. En algunos estudios se divide el tanque en zonas imaginarias para posteriormente medir el tiempo que los peces pasan en cada zona y las veces que cruzan de una a otra, estudiando la voluntad de explorar sus alrededores.	Con un software de seguimiento de video se obtiene la distancia recorrida, la velocidad media, el tiempo de inmovilidad y los patrones de nado de cada sujeto.	
Y-maze	En un tanque con 3 brazos en forma de Y, la base transparente está iluminada y los brazos están cubiertos externamente por un plástico opaco, mientras que en el interior de los brazos hay representadas diversas formas geométricas visibles para el pez. Con este diseño se pueden realizar varias pruebas para evaluar distintas variables: - <u>Alternancia espontánea (AE)</u> : se estudia la voluntad del pez cebra para explorar nuevos entornos. - <u>Memoria espacial</u> : cada brazo se designa como "brazo inicial", "brazo abierto" (siempre abierto) y "brazo novel" (abierto solo durante la fase de prueba). En la fase de entrenamiento los PC se depositan en el brazo inicial mientras el brazo novel está cerrado. En la fase de prueba los PC se depositan en el brazo inicial pero en este caso el brazo novel está abierto.. En un PC sano los resultados esperables serían que pasara más tiempo en el brazo novel durante la fase de prueba, ya que el brazo abierto ya lo habría explorado durante la fase de entrenamiento y preferirían explorar una zona nueva durante más tiempo.	- <u>AE</u> : número de alternancias espontáneas y el número total de brazos recorridos. -Memoria espacial: tiempo que el PC pasa en cada brazo y los parámetros locomotores.	
Ensayo de estímulo repulsivo con cadaverina	El tanque acuático tiene una división que separa el tanque en tres zonas: brazo izquierdo, brazo derecho y zona neutral. La cadaverina se añade al brazo en el que el pez se encuentre en el momento de la aclimatación (el cuál se llamará brazo estímulo a partir de ese momento). Se mide el tiempo de respuesta frente a un estímulo olfativo en el que el pez evita el brazo estímulo y se desplaza al brazo opuesto, lejos del estímulo de cadaverina, permitiendo el estudio de la capacidad olfatoria.		
Inhibitory Avoidance Test (IAT)	En el ensayo se utiliza una caja con una placa deslizante remota que divide la caja en una zona superficial y otra profunda. Durante la fase de entrenamiento los peces se transfieren a la zona superficial (con la placa divisora cerrada) y se les permite nadar durante 1 minuto para aclimatarse. Después la placa deslizante se abre, dejando que el pez se desplace a la zona profunda, la cual prefiere. Acto seguido se cierra la placa deslizante y se administra una descarga eléctrica al pez. La fase de prueba se inicia 24h después, durante la cual los peces se depositan individualmente en la zona superficial con la placa deslizante cerrada para una aclimatación de 1 minuto. Posteriormente se abre la placa pero no se administra ninguna descarga eléctrica. En general, el PC prefiere las áreas profundas a las superficiales y se retira rápidamente a una zona más profunda cuando se le da la opción. Este ensayo se utiliza para evaluar la memoria asociativa a largo plazo formada a través del aprendizaje del miedo.		
Prueba de agresión inducida por espejo	Un espejo se coloca con un ángulo de 25° respecto a un tanque acuático pequeño, que se divide en 4 zonas imaginarias. Cuando el PC nada hacia la zona izquierda del tanque (A1) se ve reflejado más cerca en el espejo. Entrar en el área A1 implica proximidad al "oponente" y entrar en el área A4 implica evitación.	Se mide el tiempo que el PC pasa en cada zona y los comportamientos agresivos que pueda mostrar.	

<p>Laberinto de aprendizaje latente (Hettiarachchi et al.)</p>	<p>El laberinto se compone de la zona inicial (inferior), la zona de recompensa (superior) y tres túneles (izquierdo, derecho y central). Durante la fase de entrenamiento, los PC se dividen en grupos que tendrán solamente un túnel abierto (el izquierdo o el derecho según el grupo, mientras que el central siempre permanece cerrado) y la zona de recompensa está vacía. Durante la fase de prueba se introduce el PC en la zona inicial y 5 PC a modo de estímulo en la zona de recompensa, mientras que los túneles izquierdo y derecho están abiertos y el central bloqueado. El PC sano tendrá preferencia en la fase de prueba por el túnel que haya usado para llegar a la zona estímulo durante la fase de entrenamiento.</p>	<p>Con un software de seguimiento de video se obtiene un mapa de calor del recorrido de los PC, la velocidad, la aceleración, la distancia recorrida y el tiempo en cada zona del laberinto.</p>	
<p>Ensayo de luz-oscuridad</p>	<p>Se divide un tanque acuático en dos áreas del mismo tamaño, una iluminada y la otra oscura. El PC se coloca inicialmente en el área iluminada. El PC adulto presenta normalmente preferencia por el compartimento oscuro. Los fármacos con capacidad de generar ansiedad en el PC aumentan la preferencia (y la evaluación del riesgo) en el compartimento iluminado.</p>	<p>Se mide el tiempo que pasa en esta zona y el tiempo que tarda en desplazarse al área oscura.</p>	