

---

# REVISIÓN SISTEMÁTICA SOBRE EL MODELADO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON EN EMBRIONES DE PEZ CEBRA MEDIANTE LA INDUCCIÓN CON MPTP Y ROTENONA

---

Autor: Damián Jesús González León

Tutor: Javier Santos Burgos Muñoz



GRADO DE MEDICINA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CURSO ACADÉMICO 2022 / 2023

# ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Extended summary.....	3
4. Introducción.....	5
4.1. Enfermedad de Parkinson.....	5
4.2. Pez cebra.....	7
4.3. Por qué el uso del pez cebra y, en particular, su embrión.....	9
5. Objetivos.....	10
6. Preguntas de investigación.....	10
7. Justificación de la revisión.....	11
8. Metodología.....	11
8.1. Criterios de inclusión y de exclusión.....	11
8.2. Estrategia de búsqueda.....	12
8.3. Extracción de datos.....	14
8.4. Evaluación de la calidad.....	14
9. Resultados.....	15
9.1. Selección de artículos.....	15
9.2. Evaluación del riesgo.....	16
9.3. Características de los artículos incluidos.....	17
10. Discusión.....	23
10.1. Discusión de los resultados obtenidos.....	23
10.1.1. Pérdida de neuronas dopaminérgicas.....	23
10.1.2. Sobreexpresión de ROS.....	25
10.1.3. La expresión de Pink1 / Parkin.....	25
10.1.4. Marcadores de neuro-inflamación.....	26
10.1.5. Concentraciones de acetilcolina.....	27
10.1.6. Actividad motora.....	28
10.2. Limitaciones del estudio.....	30
11. Conclusiones.....	31
12. Bibliografía.....	33

## Abreviaturas

- **AChE:** Acetilcolinesterasa
- **ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero
- **ATD:** Amantadina
- **BBRP:** Molécula derivada de la berberina
- **DAT:** Transportador de dopamina
- **DPF:** Días post fertilización
- **EP:** Enfermedad de Parkinson
- **GA:** Gardenamida A
- **GFP:** Proteína verde fluorescente
- **HB:** Dosis alta de ácido 3-piridinilborónico
- **HPF:** Horas post fertilización
- **iNOS:** Óxido nítrico sintetasa
- **LB:** Dosis baja de ácido 3-piridinilborónico
- **L-Dopa:** L-3,4-dihidroxitifenilalanina
- **MAO B:** Inhibidores de la monoaminoxidasa B
- **MPP+:** 1-metil-4-fenilpiridinio
- **MPTP:** 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina
- **NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- **PD:** Parkinson's disease
- **PINK1:** PTEN-induced kinase 1
- **RA:** Ácido rosmarínico
- **ROS:** Especies reactivas de oxígeno
- **SEL:** Seleginina

- **SEN:** Sociedad Española de Neurología
- **SOD:** Superóxido dismutasa
- **TBN:** 2-[[[(1,1-dimeteil)oxidoimino]-metil]-3,5,6-trimetilpirazina
- **TH:** Tirosina hidroxilasa
- **TMP:** Tetrametilpirazina
- **6-OHDA:** 6-hidroxi-dopamina

## 1. Resumen

**Introducción:** La enfermedad de Parkinson (EP) es una patología muy prevalente en la actualidad y cuyos mecanismos fisiopatológicos no se conocen con exactitud. El embrión de pez cebra puede ser muy útil gracias a poder generar en él un modelo de EP mediante el uso de las neurotoxinas MPTP y rotenona.

**Objetivos:** Análisis de la viabilidad del modelo de EP en embriones de pez cebra empleando las neurotoxinas MPTP y rotenona para su generación.

**Metodología:** Se realizó una selección de artículos en las bases de datos Pubmed y Scopus, considerando los objetivos y criterios de inclusión establecidos. El riesgo de sesgo se evaluó utilizando la herramienta SYRCLE's RoB.

**Resultados:** La selección comprende un total de trece artículos, doce sobre el MPTP y únicamente uno sobre la rotenona. En ellos se valoran los cambios en la locomoción, el número de neuronas dopaminérgicas, el aumento de ROS y de los marcadores neuro inflamatorios y la expresión de genes encargados de la regulación mitocondrial.

**Conclusión:** El embrión de pez cebra es un modelo que puede ser útil para el estudio de la EP y, en cuanto a las neurotoxinas empleadas en su generación, el MPTP obtiene mejores resultados que la rotenona para dicho modelado.

**Palabras clave:** embrión pez cebra, enfermedad de Parkinson, MPTP, rotenona, neuronas dopaminérgicas y estrés oxidativo.

## 2. Abstract

**Introduction:** Parkinson's disease (PD) is a highly prevalent condition whose exact pathophysiological mechanisms are not yet fully understood. The zebrafish embryo can be very useful in generating a PD model by using the neurotoxins MPTP and rotenone.

**Objectives:** Analysis of the feasibility of the PD model in zebrafish embryos using the neurotoxins MPTP and rotenone for its generation.

**Methodology:** A selection of articles was made in the Pubmed and Scopus databases, considering the established objectives and inclusion criteria. The risk of bias was evaluated using the SYRCLE's RoB tool.

**Results:** The selection comprises a total of thirteen articles, twelve on MPTP and only one on rotenone. They evaluate changes in locomotion, the number of dopaminergic neurons, increased ROS and neuroinflammatory markers, and the expression of genes involved in mitochondrial regulation.

**Conclusion:** The zebrafish embryo is a model that can be useful for studying PD, and in terms of the neurotoxins used for its generation, MPTP yields better results than rotenone for modeling PD.

**Keywords:** zebrafish embryo, Parkinson's disease, MPTP, rotenone, dopaminergic neurons, oxidative stress.

### 3. Extended summary

**Introduction:** Parkinson's disease (PD) is a chronic neurodegenerative disorder characterized by progressive degeneration of the nervous system. Its exact pathophysiology is still not fully understood, and there is currently no direct treatment for the disease, only for its symptoms. Environmental toxins such as 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), 6-hydroxydopamine (6-OHDA), or rotenone are known to increase the risk of developing PD. Animal models, such as the zebrafish model, are employed to better understand PD. Zebrafish models offer several advantages as an intermediate model between in vitro cellular models and higher vertebrate models. They exhibit rapid development and share physiological similarities with humans and other higher vertebrates, making them a unique tool for studying the disease and potential therapeutic interventions

**Objectives:** The main objective of this review is to analyze the feasibility of the zebrafish embryo model in studying PD. The secondary objective is to assess the possibility of generating this model using the neurotoxins MPTP and rotenone.

**Methodology:** A selection of articles obtained from the PubMed and Scopus databases using the keywords "MPTP," "rotenone," "zebrafish embryo," and "parkinsonism" is performed. Inclusion criteria include observational studies, texts published in any language, texts utilizing zebrafish embryos or larvae with a maximum lifespan of 72 hours, and texts employing rotenone or MPTP as neurotoxins. Exclusion criteria include systematic reviews or meta-analyses, texts using zebrafish beyond 72 hours of life, and any study using live organisms other than zebrafish. The selected articles are assessed for risk of bias using the SYRCLE's RoB tool, which consists of 10 items evaluating different types of bias, including selection bias, performance bias, detection bias, reporting bias, and attrition bias. Finally, a data extraction table is created to summarize the obtained information, including title, author, publication date, study location, study type, sample description, exposure and intervention, and study results.

**Results:** Following the application of inclusion and exclusion criteria, a final set of thirteen articles addressing the PD model, predominantly using the neurotoxin MPTP and one using rotenone, is obtained. Generally, these articles compare the effects of neurotoxins on healthy individuals, with a healthy control group and a group exposed to the neurotoxin along with a potential substance or molecule that could reverse its effects. The results consistently show a significant reduction in the number of dopaminergic neurons in MPTP-exposed groups compared to the control group. The reduction ranges from over 50% to 90% in different studies. Decreases in the length of dopaminergic neurons, swimming capacity, and motor response of animals exposed to MPTP are also recorded. Variations in the expression of PINK1 and Parkin and increased levels of oxidative stress are observed in MPTP-exposed groups. The study utilizing rotenone as a neurotoxin demonstrates morphological alterations in exposed embryos; however, these changes are not characteristic of PD. The results indicate that MPTP-exposed zebrafish embryos can induce pathological changes related to PD, whereas the rotenone model does not exhibit such evidence.

**Conclusion:** The zebrafish embryo model of PD using the neurotoxin MPTP is a valuable tool for studying the disease. This model enables visualization and analysis of key features of PD, such as dopaminergic neuron loss and mobility impairment. Regarding rotenone, the review did not find conclusive data supporting its use as a neurotoxin to generate a PD model in zebrafish embryos. Therefore, according to this review, it would be preferable to use MPTP as the neurotoxin instead of rotenone.

## 4. Introducción

### 4.1. Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es una patología en la cual se produce una degeneración progresiva y crónica del sistema nervioso y que se encuentra incluida dentro del grupo patologías del movimiento.

Epidemiológicamente, se trata del trastorno neurodegenerativo del movimiento más común. Según la Sociedad Española de Neurología (SEN) (4), es una patología con una prevalencia de un 0 '3% en la población general, un 4% de estos en personas mayores de 80 años, y una tasa de incidencia anual de 8 - 18 personas enfermas por cada 100.000.

La enfermedad de Parkinson se caracteriza principalmente por una pérdida o degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra de la pars compacta, así como de la acumulación de una proteína mal plegada denominada alfa-sinucleína en el interior de los cuerpos de Lewy, unas inclusiones intracitoplasmáticas que se emplazan en dichas neuronas. Adicionalmente, se ha visto que la degeneración de neuronas dopaminérgicas se ve producida por un aumento del estrés oxidativo, con su consecuente liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), una degeneración mitocondrial, que provoca apoptosis y degeneración celular, y un estado generalizado de neuroinflamación (1). Todos estos son factores estarían relacionados con el mal plegamiento de la alfa-sinucleína y, por tanto, en el desarrollo de la enfermedad de EP.

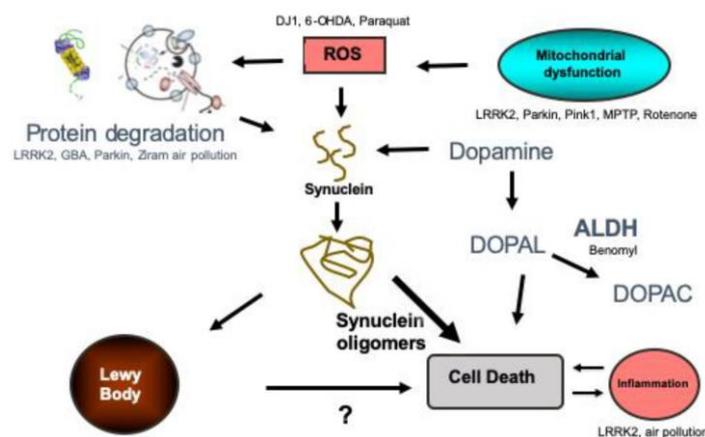


Figura 1. Esquema de la fisiopatología observada en el desarrollo de la EP según Burnhill et al (6).

Atendiendo a su etiología, la EP es una enfermedad compleja cuya aparición se debe al efecto sumatorio de factores tanto genéticos como ambientales.

Dentro de los factores genéticos, se han identificado diferentes genes que pueden intervenir en el desarrollo de la enfermedad y, según Balestrino et al (3), se ha visto que las formas familiares de EP representan entre el 5 % y el 15 % de los casos. Esto muestra que los antecedentes familiares suponen un factor de riesgo importante en la patología. Algunos de los genes que pueden intervenir en la aparición de la enfermedad como son el gen SNCA, que codifica la proteína alfa-sinucleína, o el LKCR2, que codifica la serina/treonina-proteína quinasa 2.

Por otro lado, se ha visto una relación epidemiológica entre diferentes tóxicos ambientales como ciertos pesticidas y productos químicos, y el aumento del riesgo para el desarrollo de la EP. Dentro de estos tóxicos ambientales, podemos encontrar el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP), la 6-hidroxidopamina (6 - OHDA) o la rotenona. A lo largo de este trabajo, se desarrolla la implicación del MPTP y la rotenona en este proceso.

La enfermedad de Parkinson comprende una gran variedad de síntomas, tanto de características motoras como no motoras. Sin embargo, los cuatro principales son bradicinesia, rigidez muscular, temblor de reposo e inestabilidad postural. Según el Banco de Cerebros de la Sociedad de enfermedad de Parkinson del Reino Unido, para el diagnóstico de Enfermedad de Parkinson, es necesaria la aparición de bradicinesia junto a uno de los tres síntomas principales indicados anteriormente.

**Table 2** Motor and non-motor symptoms of Parkinson disease (PD)

Motor symptoms	Non-motor symptoms
Tremor	Hyposmia
Rigidity	Psychiatric symptoms: depression, anxiety, apathy hallucinations, psychosis
Bradykinesia/akinesia/hypokinesia	Dementia/cognitive impairment
Postural instability	Sensory symptoms
Postural abnormalities (camptocormia, Pisa syndrome)	Genitourinary symptoms: urinary frequency, urgency, reduced libido, sexual dysfunction
Gait disturbances (freezing of gait, festination, start/target/obstacle hesitation)	Gastrointestinal symptoms: constipation, delayed/reduced stomach emptying
Alterations in blinking/eye movements	Dysphagia, sialorrhoea, dysarthria, hypophonia
Hypomimia	Disturbances of sleep and wakefulness
Micrographia	Cardiovascular symptoms: blood pressure variations (postural, postprandial), dysrhythmias

*Imagen 2. Principales síntomas tanto motores como no motores de la enfermedad de Parkinson. Balestrino et al (3).*

En cuanto a su tratamiento, se utilizan fármacos para tratar sus síntomas, ya que no existe ninguna terapia que modifique la evolución natural de la enfermedad. Desde el ámbito farmacológico, los tratamientos que se emplean se centran, principalmente, en actuar sobre la vía dopaminérgica, aunque también existe tratamiento específico frente a otros sistemas de neurotransmisión como la acetilcolina (5).

Entre los fármacos que se emplean encontramos la levodopa, los agonistas dopaminérgicos, los inhibidores de la monoaminoxidasa B (MAO-B), los inhibidores de la catecol-o-metiltransferasa, la amantadina, la safinamida o la apomorfina.

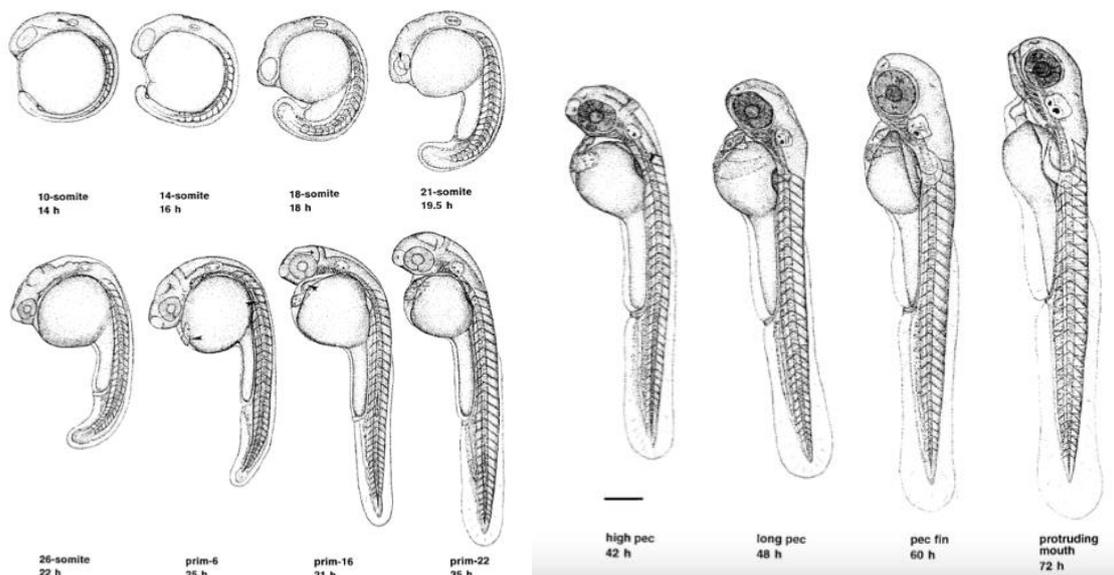
## 4.2. Pez cebra

El *Danio rerio* es un pez vertebrado, más comúnmente conocido como pez cebra, perteneciente a la familia de los *Cyprinidae* y cuyo hábitat son entornos de agua dulce. Es una especie que presenta un alto uso en acuarios y, sobre todo, en investigación científica, aspecto sobre el que desarrollamos esta revisión.

Se trata de un pez fusiforme con un tamaño que oscila entre los 3 - 5 cm, con una aleta dorsal solitaria, dos barbillas, dos ojos situados en posición central y una boca dirigida hacia arriba. Su nombre se debe a su aspecto ya que presenta un color plateado junto con una bandas longitudinales situadas en sus costados de color azul oscuro que le otorgan el aspecto cebrado al que debe su nombre.

Se trata de un organismo ovíparo con fecundación externa en grupos y con dispersión de sus huevos. Presenta un periodo de desarrollo embrionario que dura 72 horas hasta que se convierte en larva temprana y a lo largo de esta va pasando por diferentes etapas que están descritas por Kemel et al (6).

Estas etapas son: **Cigoto** (0 horas), **Período clivaje** (0'7 – 2'2 horas), **Período blástula** (2'15 – 5'15 horas), **Período gástrula** (5'15 – 10 horas), **Segmentación** (10 – 24 horas), **Período faríngrula** (24 – 48/72 horas), **Período de eclosión** (72 horas aproximadamente) y **Larva temprana**.



*Imagen 3. Etapas de crecimiento y desarrollo del pez cebra según Kemel et al (6).*

### **4.3. Por qué el uso del pez cebra y, en particular, su embrión.**

La EP es una patología en la que se produce una degeneración progresiva y crónica del sistema nervioso. Su fisiopatología, actualmente, no se conoce con exactitud y tampoco existe un tratamiento directo frente a la misma, únicamente contra sus síntomas. Por esta razón, se emplean modelos animales con el objetivo de obtener un mayor conocimiento de la EP. En ellos se busca generar modelos bioquímicos que imiten, de la manera más fiel posible, las lesiones neuropatológicas que se producen en los enfermos. Uno de estos modelos animales es el modelo del pez cebra.

El modelo de pez cebra resulta de gran utilidad ya que proporciona un modelo intermedio complementario entre los modelos celulares in vitro, y los modelos de mamíferos como los roedores. Como organismo vertebrado, presenta un desarrollo rápido y muy similar a nivel fisiológico que en los humanos o los vertebrados superiores. Además, según Lin et al. (13), el genoma del pez cebra tiene un 71'4% de homología con el humano, y el 82% de los genes de enfermedades humanas se han definido en el genoma del pez cebra.

El pez cebra presenta muchas ventajas. Su pequeño tamaño y su fácil y económica obtención permite poder mantener varios ejemplares en un espacio reducido y con un gasto económico bajo. Además, en ellos se pueden realizar estudios de alto rendimiento de manera automatizada. Presentan unos tiempos de desarrollo corto y una fertilidad constante durante todo el año además de poder obtener de un único ejemplar, muchos individuos. Se trata de un animal muy estudiado por lo que tenemos un gran conocimiento de su biología y su genoma se encuentra completamente secuenciado. Además, al ser un organismo con reproducción externa, se pueden modificar los óvulos sin dañar a los progenitores y, así, se minimiza la variación genética y se maximizan las repeticiones experimentales.

En la EP, cobra gran importancia el estudio del sistema dopaminérgico. En el pez cebra, dicho sistema se encuentra muy bien caracterizado ya que, las neuronas dopaminérgicas, se encuentran en su diencéfalo ventral y, desde ese

punto, se envían proyecciones al subpalio del telencéfalo ventral, que sería el homólogo del cuerpo estriado humano (13).

En esta revisión, particularmente, se estudia la EP en embriones de pez cebra. Estos, además de las ventajas propias del pez cebra comentadas anteriormente, presentan una serie de características que le otorgan otro tipo de beneficios para su estudio.

Los embriones, a diferencia de los adultos, presentan transparencia lo cual permite su estudio mediante técnicas no invasivas. La administración de fármacos se puede realizar a través de un medio acuoso, aunque para ello es necesaria la eliminación del corion de los embriones, ya que este actúa como barrera. Además, los fármacos o sustancias aplicadas presentan mayor penetrancia al sistema nervioso debido a que aún se encuentra en desarrollo su barrera hematoencefálica. Por último, al tratarse de embriones con menos de cinco días de vida, no es necesaria una aprobación ética para su uso según lo establecido por el Consejo de Europa (1986).

## 5. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es la realización de una revisión sistemática acerca del modelo de pez cebra en su forma embrionaria para el estudio de la enfermedad de Parkinson (EP) en base a la experimentación científica.

Los objetivos secundarios buscan analizar y constatar el empleo del MPTP y la rotenona para la generación de la EP en el modelo embrionario de pez cebra.

## 6. Preguntas de investigación

- ❖ ¿Puede el MPTP generar un modelo de EP en embrión de pez cebra?
- ❖ ¿Qué efectos parkinsonianos se observan en un modelo de EP tratado con MPTP en embrión de pez cebra?
- ❖ ¿Puede la rotenona generar un modelo de EP en embrión de pez cebra?

- ❖ ¿Qué efectos parkinsonianos se observan en un modelo de EP tratado con rotenona en embrión de pez cebra?

## 7. Justificación de la revisión

La EP, es una patología neurodegenerativa incurable que afecta a una gran cantidad de personas en la actualidad. Se trata de una enfermedad en la que existen muchos elementos, tanto a nivel fisiopatológico como a nivel terapéutico, que son desconocidos o la información que se tiene acerca de los mismos es insuficiente. Por ello, los pacientes únicamente se pueden someter al tratamiento sintomático existente, aunque este no retrase o detenga la enfermedad.

Con esta revisión, buscamos analizar un modelo intermedio de estudio, entre el modelo celular y el modelo vertebrado superior, con el objetivo de poder conocer y comprender más acerca de la EP, y disponer de un modelo que permita la extrapolación de los datos obtenidos de forma sencilla y eficaz.

## 8. Metodología

### 8.1. Criterios de inclusión y de exclusión

Para realizar la selección de los artículos más adecuados en función de los objetivos y las preguntas planteadas en la revisión sistemática se han empleado los siguientes criterios:

#### Criterios de inclusión:

- Textos publicados en cualquier idioma.
- Textos en los que se empleen para los estudios embriones o larvas de pez cebra hasta las 72 horas post fertilización (hpf).
- Textos en los que se emplee como neurotóxico la rotenona o el MPTP.

### **Criterios de exclusión:**

- Revisiones sistemáticas o metaanálisis.
- Textos en los que únicamente se empleen individuos peces cebra con más de 72 horas post fertilización (hpf).
- Cualquier estudio que emplee únicamente organismos vivos que no sean peces cebra.

## **8.2. Estrategia de búsqueda**

Una vez establecidos los criterios necesarios para alcanzar los objetivos de la revisión, se ha realizado una búsqueda de artículos en las bases de datos de PubMed y Scopus.

En una primera búsqueda se emplearon las palabras clave “zebrafish embryo” y “Parkinson” unidas ambas a través del operador booleano AND. Debido a que los resultados obtenidos eran demasiado poco específicos y los resultados obtenidos no permitían responder correctamente a las preguntas de investigación propuestas, se realizó una segunda búsqueda.

En esta segunda búsqueda se realizó un análisis más selectivo de las neurotoxinas a estudio. Para ello, se emplearon las palabras clave “zebrafish embryo” y “rotenone”, y “zebrafish embryo” y “MPTP”, unidas ambas a través del operador booleano AND. Esta segunda búsqueda, aunque más específica, no es lo suficientemente selectiva con la patología a estudio. Por ello, se decide realizar una tercera búsqueda añadiendo a la anterior la palabra clave “parkinsonism” unida, en ambas, a través del operador booleano AND.

Finalmente, se realiza una lectura de los títulos, abstracts y textos completos con el objetivo de descartar los artículos repetidos y los que no cumplen los criterios de inclusión establecidos.

Con este último análisis, se consigue una búsqueda muy específica cuyos resultados permiten estudiar y responder las preguntas de investigación planteadas y alcanzar los objetivos propuestos al comienzo.

Bases de datos	Orden	Búsqueda	Número de resultados
<b>Pubmed</b>	1	(zebrafish embryo) AND (Parkinson,,,"(zebrafish"[MeSH Terms]) AND ("embryo s"[All Fields]) AND ("parkinson disease"[MeSH Terms])"	88
	2	(zebrafish embryo) AND (rotenone),,"(zebrafish"[MeSH Terms]) AND ("embryo s"[All Fields]) AND ("rotenone"[MeSH Terms])"	16
	3	(zebrafish embryo) AND (MPTP),,"(zebrafish"[MeSH Terms]) AND ("embryo s"[All Fields]) AND ("1 methyl 4 phenyl 1,2,3,6 tetrahydropyridine"[MeSH Terms])"	24
	4	((zebrafish embryo) AND (rotenone)) AND (Parkinsonism),,"(zebrafish"[MeSH Terms] AND ("embryo s"[All Fields]) AND ("rotenone"[MeSH Terms]) AND "parkinsonism"[All Fields]	3
	5	((zebrafish embryo) AND (MPTP)) AND (parkinsonism),,"(zebrafish"[MeSH Terms] AND ("embryo s"[All Fields]) AND ("1 methyl 4 phenyl 1,2,3,6 tetrahydropyridine"[MeSH Terms] OR "1 methyl 4 phenyl 1 2 3 6 tetrahydropyridine"[All Fields] OR "mptp"[All Fields]) AND "parkinsonism"[All Fields]	19
<b>Scopus</b>	1	( TITLE-ABS-KEY ( zebrafish AND embryo ) AND TITLE-ABS-KEY ( parkinson ) )	154
	2	( TITLE-ABS-KEY ( zebrafish AND embryo ) AND TITLE-ABS-KEY ( rotenone ) )	37
	3	( TITLE-ABS-KEY ( zebrafish AND embryo ) AND TITLE-ABS-KEY ( mptp ) )	43
	4	( TITLE-ABS-KEY ( zebrafish AND embryo ) AND TITLE-ABS-KEY ( rotenone ) AND TITLE-ABS-KEY ( parkinsonism ) )	3
	5	( TITLE-ABS-KEY ( zebrafish AND embryo ) AND TITLE-ABS-KEY ( mptp ) AND TITLE-ABS-KEY ( parkinsonism ) )	14

Figura 4. Tabla en la que se muestra la estrategia de búsqueda seguida

### **8.3. Extracción de datos**

Tras realizar una adecuada selección de artículos con el objetivo de responder las preguntas de investigación formuladas y alcanzar los objetivos, se realiza un análisis de los estudios en función de:

- Título del estudio
- Autor, título y país donde se realiza el estudio
- Descripción de la muestras
- Métodos de exposición e intervención del estudio
- Resultados del estudio
- Variables de ajuste
- El riesgo de sesgo según la herramienta SYRCLE's RoB para la evaluación del riesgo de sesgo en experimentación animal

### **8.4. Evaluación de la calidad**

Una vez realizada la selección de artículos, es necesario realizar una evaluación de su calidad para valorar tanto la calidad metodológica y la validez de los artículos, como sus posibles sesgos, errores sistemáticos y su fiabilidad para así poder garantizar la veracidad y la objetividad de los resultados obtenidos y obtener los resultados esperados con la revisión.

Teniendo en cuenta el contenido de la revisión, al tratarse de estudios preclínicos y de investigación con modelos animales, se pueden emplear diferentes tipos de herramientas como la escala QATRS (Quality rating scale as an animal/tissue research scale), la CAMARADES 10-Ítem checklist o la escala SYRCLE's RoB.

En el caso de esta revisión, se emplea la herramienta SYRCLE's RoB (14) para la evaluación del riesgo de sesgo en experimentación animal. Esta herramienta está compuesta por 10 ítems en los cuales se valoran seis tipos de sesgos: el sesgo de selección, el sesgo de desempeño, el sesgo de detección, el sesgo de

deserción, el sesgo de informe y otros posibles sesgos. Estos ítems se valoran con respuestas de “sí”, “no” o “poco claro”. Una respuesta afirmativa indicaría un bajo riesgo de sesgo, una respuesta negativa indicaría un alto riesgo de sesgo, y una respuesta “poco clara” indicaría que no hay suficiente información para poder valorar los riesgos del estudio.

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? (*)

Figura 5. Herramienta SYRCLE's RoB para valoración de riesgo de sesgos en el estudio (14)

## 9. Resultados

### 9.1. Selección de artículos

Como hemos comentado anteriormente en el punto 8.2, se realizó una búsqueda inicial en las bases de datos utilizadas en las que se obtuvieron un total de 242 artículos. Tras esto se realizó una búsqueda más selectiva sobre las neurotoxinas que se quieren analizar en la revisión: la rotenona y el MPTP. Con todo esto se hallaron un total de 120 artículos, 53 acerca de la rotenona y 67 acerca del MPTP. A continuación, se acotó la búsqueda añadiendo el término “parkinsonismo” obteniendo un total de 39 artículos.

A continuación, al tener una base de artículos adecuada para el análisis, se decide eliminar los artículos duplicados y las revisiones sistemáticas o metaanálisis, quedando un total de 28 artículos.

Finalmente, se procede a realizar la lectura tanto del abstract como del texto completo de todos los artículos restantes. Tras la lectura, se eliminan 15 artículos, 14 de ellos porque no cumplen los criterios de inclusión establecidos al comienzo y uno debido a que no se tiene acceso al texto.

De este modo, se obtiene un total de artículos finales de 13, a partir de los cuales se llega a las preguntas y objetivos fijados al comienzo de la revisión.

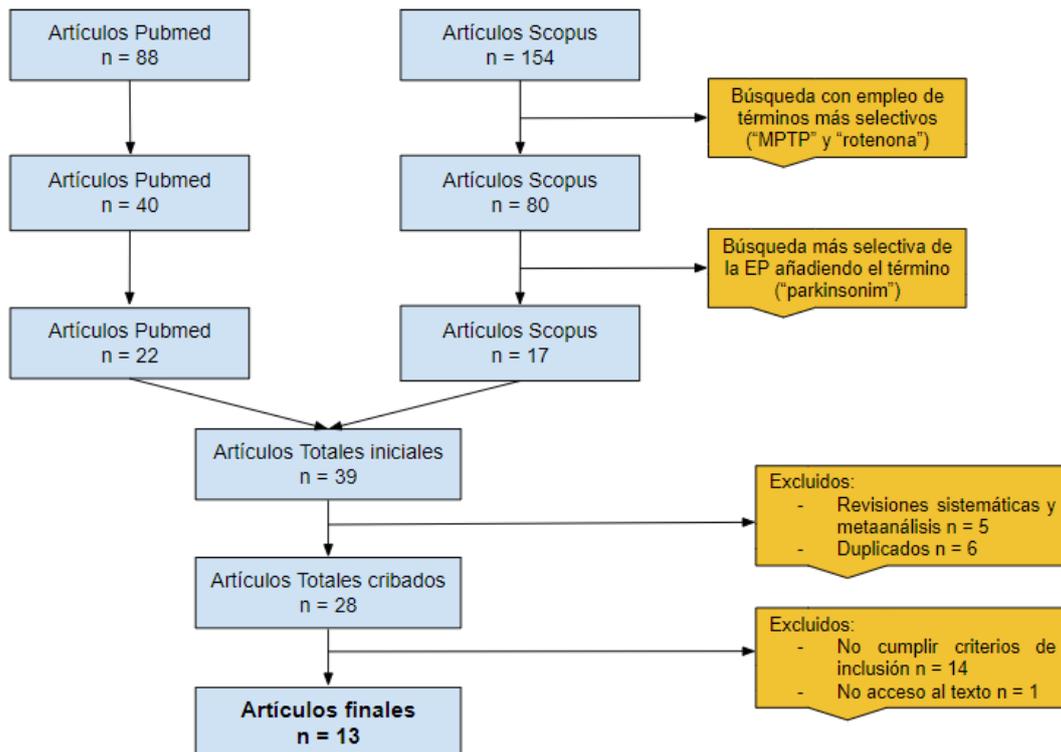


Figura 6. Diagrama de flujo de los artículos obtenidos para la revisión

## 9.2. Evaluación del riesgo

Como se puede ver en el anexo 2, según la escala SYRCLE's RoB, todos los estudios presentan un bajo riesgo de sesgo de selección ya que todos responden afirmativamente a los tres dominios analizados.

Respecto al sesgo de rendimiento, todos los artículos responden negativamente al dominio cegador, ya que no se describen medidas para ocultar a los investigadores las intervenciones dadas a cada uno de los animales empleados. Sin embargo, en el dominio de asignación aleatoria las cajas dentro de las

instalaciones de animalario, las respuestas obtenidas son poco claras en todos los artículos salvo en Zhao et al (22), Hu et al (27) y Díaz-Casado et al (29), donde sí que se describe claramente la repartición aleatoria de los animales para las diferentes intervenciones. Por ello, todos los artículos presentan un riesgo alto de sesgo para el dominio cegador pero un riesgo bajo en los artículos citados anteriormente, y un riesgo intermedio respecto al dominio de asignación aleatoria de cajas.

En el sesgo de detección, se observa un bajo riesgo de sesgo en el dominio de evaluación aleatoria de resultados, ya que todos los artículos responden afirmativamente a la pregunta. Sin embargo, existe un alto riesgo de sesgo en el dominio cegador ya que, al igual que comentamos en el sesgo de rendimiento, no se incluye una descripción de las medidas para la evaluación de los investigadores.

Para el sesgo de desgaste, existe un alto riesgo de sesgo en todos los artículos menos en el Üstündag et al (30). Esto es debido a que, en dicho artículo, se describen los sujetos descartados o eliminados de los resultados finales.

Para el sesgo de reporte, existe un bajo riesgo de sesgo en todos los artículos ya que responden afirmativamente a la pregunta planteada en él.

Por último, en otros tipos de sesgos, todos los artículos responden afirmativamente ya que no se describen u observan otros posibles problemas en los mismos que pudiesen condicionar un posible sesgo.

En el anexo 1 se encuentra la tabla con el análisis del riesgo de sesgo en cada uno de los trece artículos de la revisión

### **9.3. Características de los artículos incluidos**

En el anexo 2 se encuentra la tabla con la extracción de datos de cada uno de los artículos en los cuales se recoge título, autor, fecha, lugar de realización, tipo de estudio, exposición e intervención, descripción de la muestra y resultados del estudio.

Finalmente, tras aplicar todos los criterios anteriormente comentados, trece artículos fueron incluidos en la revisión final. Todos los artículos seleccionados son modelos preclínicos de investigaciones sobre animales, de los cuales, doce desarrollan el modelo de la EP empleando la neurotoxina MPTP y, únicamente uno de ellos, emplea la rotenona. En dichos artículos se compara la acción de las dos neurotoxinas aplicadas sobre individuos sanos, habiendo siempre un grupo control sano, un grupo expuesto al tóxico y a una posible sustancia o molécula que revierta la acción de la neurotoxina. Por otro lado, respecto a los estudios escogidos, ocho han sido realizados en China (18, 20, 22, 23, 25, 26, 27, 28) y, del resto, tres de ellos se han realizado en Turquía (19, 21 y 30), uno en Francia (24) y uno en España (129). Además, la mayoría de los estudios se han realizado entre 2016 y 2023 aunque hay alguno que es anterior a estos (24 y 25).

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- ❖ **Wang et al (18):** En este artículo se estudia la longitud de las neuronas dopaminérgicas de peces cebra de 72 hpf al ser expuestos a 50  $\mu$ M de MPTP. Las neuronas dopaminérgicas fueron marcadas con proteína verde fluorescente (GFP) y se pudo observar cómo, en el grupo expuesto a MPTP, la longitud de dichas neuronas se redujo más de un 20% respecto al grupo control sano y el grupo tratado con la molécula derivada de la berberina (BBRP), que revertía la acción del MPTP.
  
- ❖ **Cansiz et al (19):** En este artículo se estudian los efectos del MPTP entre las 24 hpf y las 92 hpf. El resultado obtenido fue una disminución de un 75% en las tasas de eclosión de los embriones expuestos únicamente a MPTP, una disminución de la locomoción de 1 cm/segundo, una disminución de la actividad de la AChE de 12'5 U/mL y un aumento en la expresión de PINK1, todo ello respecto al grupo control.

- ❖ **Duan et al (20):** En este artículo se estudia tanto el número de neuronas dopaminérgicas, mediante la inmunohistoquímica de tirosina hidroxilasa (TH) como la capacidad de natación, medida en función del tiempo necesario para escapar de un área delimitada, en el grupo expuesto a MPTP en comparación con otros tres grupos, uno de control y otros dos a los que se le aplica una sustancia que revierte la acción del MPTP, la teacrina y el depranil. Según los resultados, se puede observar una disminución de más de la mitad de las neuronas dopaminérgicas en el grupo expuesto a MPTP en relación con el grupo control. También existe disminución de dicho número con respecto a los otros dos grupos, aunque no tan marcada. Con respecto a la prueba de natación, el tiempo necesario para escapar por parte del grupo expuesto a MPTP duplica al del grupo control y también es mayor respecto a los otros dos grupos.
  
- ❖ **Üstündag et al (21):** En este artículo se estudian las tasas de eclosión, la capacidad de locomoción en función de la respuesta de escape promedio y la expresión de PINK1. Según los resultados obtenidos, la tasas de eclosión disminuyeron en torno a un 17% en el grupo expuesto a MPTP en relación con el grupo control. Por otro lado, la respuesta de escape promedio disminuyó significativamente con respecto al control. Finalmente, la expresión de PINK1 se duplicó en el grupo expuesto a MPTP en comparación con el grupo control.
  
- ❖ **Zhao et al (22):** En este artículo se estudian en embriones de pez cebra tanto el número de neuronas dopaminérgicas, mediante el marcaje inmunohistoquímica de TH (neuronas dopaminérgicas TH positivas), como la cantidad de ROS presente. Tras exponer los embriones a MPTP se observa como el número de neuronas dopaminérgicas TH positivas disminuye más de un 60% y como los niveles de ROS aumentaron un 25% todo ello respecto al grupo control.

- ❖ **Guo et al (23):** En este artículo se estudia el número de neuronas dopaminérgicas presentes en embriones de pez cebra tratados con MPTP en relación con el grupo control. Dicho número se estudia a partir del marcaje de la TH presente en dichas neuronas, a las cuales se le denomina neuronas dopaminérgicas TH positivas. En los resultados se observa como hay una reducción de, aproximadamente, un 70 % de neuronas dopaminérgicas TH positivas en comparación con el grupo control.
  
- ❖ **Lam et al (24):** En este artículo se estudia el número de neuronas dopaminérgicas presentes en embriones de pez cebra tratados con MPTP, la especificidad del MPTP por dichas neuronas y la respuesta motora del grupo expuesto a MPTP con respecto al grupo control. En cuanto a las neuronas dopaminérgicas, para el estudio de su número se emplea el transportador de dopamina (DAT) exclusivo de las neuronas dopaminérgicas y para la especificidad se emplea el marcaje inmunohistoquímico de la TH. Los resultados muestran una disminución de neuronas dopaminérgicas de, aproximadamente, un 90% a las 72 hpf. Por otro lado, mediante el marcaje de TH, se pudo observar cómo únicamente se observaba esa reducción de neuronas dopaminérgicas y no en otro tipo de neuronas. Finalmente, respecto a la respuesta motora, se puede observar como en los individuos expuestos a MPTP se producen unos movimientos reflejos débiles en contraposición con los fuertes movimientos reflejos que se producen en el grupo control sano.
  
- ❖ **Zhu et al (25):** En este artículo se estudia, tanto la capacidad locomotora, como la cantidad de neuronas dopaminérgicas presentes en el grupo de peces expuestos a MPTP, en relación con el grupo control y el resto de los grupos. La capacidad locomotora se estudia calculando el tiempo que tardan cada grupo en salir de un área delimitada tras un estímulo. Según dicho estudio, la capacidad locomotora se vio reducida en el grupo

expuesto a MPTP ya que el tiempo era de 7 '86 segundos, mientras que el tiempo del grupo control fue de 3' 63 segundos. En cuanto a las neuronas dopaminérgicas, la cantidad de estas se estudia mediante en DAT y se puede observar una disminución del 40% de neuronas dopaminérgicas con respecto al grupo control.

- ❖ **Dong et al (26):** En este artículo se estudia la capacidad locomotora, la apoptosis celular cerebral, el número de neuronas dopaminérgicas y los niveles de estrés oxidativo que presentan un grupo de embriones de pez cebra expuestos a 1  $\mu$ M de MPTP respecto a un grupo control sano. La capacidad locomotora no presenta diferencias significativas hasta las 72 hpf al analizar el grupo estudio con respecto al grupo control. El nivel de estrés oxidativo, expresado a través de superóxido dismutasa (SOD), presenta un aumento significativo a las 72 hpf en el grupo expuesto a MPTP. A nivel cerebral, se observa un aumento de células apoptóticas y, particularmente, en las regiones donde se encuentran las neuronas dopaminérgicas. Finalmente, el número de neuronas dopaminérgicas calculadas a través del marcaje de TH muestra una pérdida significativa en las regiones retinianas, aunque, a nivel cerebral, a las 72 hpf no se observan alteraciones.
  
- ❖ **Hu et al (27):** En este artículo se estudian los niveles de TH y los niveles de expresión de PARK1 y PARKIN al ser expuesto a unas concentraciones de 100 y 200  $\mu$ M de MPTP. Respecto a los niveles de TH, se observa una disminución significativa tras la exposición a 200  $\mu$ M de MPTP, lo que indica una disminución del número de neuronas dopaminérgicas. Por el contrario, PARK1 y PARKIN sufren un aumento significativo de sus cifras dependiendo de las concentraciones de MPTP aplicadas.

- ❖ **Yao et al (28):** En este artículo se estudia la cantidad de neuronas dopaminérgicas y la actividad locomotora de larvas de 72 hpf expuestas MPTP en comparación con el grupo control y los grupos expuestos a Loganina. El número de neuronas dopaminérgicas se estudia a través del marcaje de la TH y se observa una reducción significativa en dicho número en el grupo expuesto a MPTP. Respecto a la actividad locomotora, se estudia mediante el cálculo de la distancia total recorrida y la velocidad promedio y los resultados obtenidos muestran una disminución tanto de la distancia como de la velocidad del 75% aproximadamente respecto al grupo control.
  
- ❖ **Díaz-Casado et al (29):** En este artículo se estudia la cantidad de neuronas dopaminérgicas, la expresión de PINK1 y PARKIN, los cuales se encargan de la regulación mitocondrial, y la cantidad de óxido nítrico sintetasa (iNOS) en un grupo de embriones de 72 hpf. El número de neuronas dopaminérgicas se estudia a través del marcaje de TH y se puede observar una disminución del 50 % en las mismas en el grupo expuesto a únicamente a MPTP. La expresión PARKIN fue indetectable a través de Western Blot y PARK1 se vio disminuida significativamente. Estos mismos hallazgos se correlacionan con el estudio de estas a través de ARNm. Por último, se observa un incremento muy significativo en los niveles de iNOS y, particularmente, este incremento era mayor en el diencéfalo y bulbo olfatorio.
  
- ❖ **Üstündag et al (30):** En este artículo se estudian las diferencias morfológicas y las tasas de eclosión del grupo de embriones expuestos a rotenona respecto al grupo control y el resto de los grupos. A nivel morfológico, se pueden observar las siguientes alteraciones: malformación de la cabeza, edema pericárdico, hemorragia, aumento de la curvatura espinal y aumento de la curvatura dorsal. Respecto a las

tasas de eclosión, se puede observar una ligera disminución, aunque no de manera sustancial en comparación con el grupo control.

## 10. Discusión

### 10.1. Discusión de los resultados obtenidos

La EP es una enfermedad muy prevalente, cuyos mecanismos no se conocen con detalle y de la que no se dispone de tratamiento efectivos. Con esta revisión sistemática buscamos evaluar un modelo animal con el cual, el estudio de la enfermedad se facilita y permite conocerla más en profundidad y buscar fármacos eficaces frente a la misma.

La EP es una enfermedad que se caracteriza principalmente por una pérdida o degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra de la pars compacta. El MPTP y la rotenona son dos compuestos empleados en el modelado de la EP en animales y, uno de esos modelos, es el pez cebra.

De los artículos incluidos en la revisión, en doce de ellos, se analiza el modelo generado mediante MPTP y, únicamente, en uno de ellos se estudia la rotenona.

El modelo de EP en embriones de pez cebra mediante MPTP se evalúa mediante la pérdida de neuronas dopaminérgicas, la sobreexpresión de especies reactivas de oxígeno (ROS), la expresión de Pink1 / Parkin, los marcadores de neuroinflamación, las concentraciones de AChE y la actividad motora observada en los sujetos de investigación. A continuación, analizaremos los diferentes indicadores.

#### 10.1.1. Pérdida de neuronas dopaminérgicas

La pérdida de neuronas dopaminérgicas es la característica principal observada en la EP. Para valorar dicha pérdida se emplea el transportador de dopamina (DAT) y las neuronas dopaminérgicas tirosina - hidroxilasa (TH) positivas. A destacar que en el trabajo de Wang et al (18), no se valora la pérdida de dichas neuronas, sino que se evalúa la disminución en su longitud.

El DAT es un transportador exclusivo de las neuronas dopaminérgicas capaz de captar, por su alta afinidad, el metabolito activo del MPTP (MPP+), inhibiendo el complejo mitocondrial I y provocando finalmente la apoptosis celular (24). Como se observa en los artículos 24 y 25, existe una reducción de DAT en los embriones expuestos a MPTP lo que sería indicativo de pérdida neuronal.

La TH es una enzima de la ruta de L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-Dopa) que más tarde se convertirá en dopamina, por tanto, las neuronas dopaminérgicas son TH positivas ya que su función es la producción de este neurotransmisor. Por medio de la hibridación in situ y el marcaje de TH, se puede observar si existe disminución de neuronas TH positivas al inducir daño con MPTP. Como podemos observar en los artículos 20, 22, 23, 24, 26, 27, 28 y 29, en todos ellos se observa una disminución de neuronas dopaminérgicas marcadas TH positivas de, incluso, más un 60%, como se puede observar en el estudio 23.

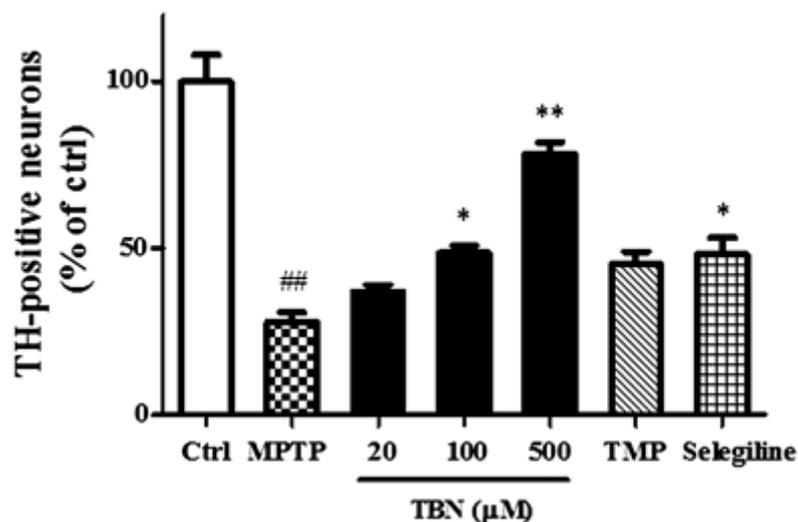


Figura 7. Gráfico del porcentaje de neuronas dopaminérgicas TH positivas según Guo et al (23)

Además, según Wang et al (18), el MPTP provoca una disminución de la longitud de las células dopaminérgicas.

Todo esto indica que, tras la aplicación de MPTP, se observa una clara disminución en número o en longitud de las células dopaminérgicas como ocurre fisiológicamente en la EP. Por esta razón, el MPTP es una buena neurotoxina

para modelar la pérdida o degeneración de neuronas dopaminérgicas que se puede observar en la EP.

#### 10.1.2. Sobreexpresión de ROS

ROS son el conjunto de moléculas producidas durante el proceso del metabolismo del oxígeno, principalmente en la cadena respiratoria mitocondrial y la NADPH - oxidasa. En condiciones de normalidad, dichas moléculas no ocasionan daños en el organismo debido a los procesos de reparación que éste posee. Cuando ROS excede la capacidad de reparación, provoca la muerte celular, como ocurre en la EP con las neuronas dopaminérgicas.

En 2 de los 14 estudios (22 y 29) se estudió el aumento de las especies reactivas de oxígeno al ser expuestos los individuos a MPTP. Según éstos, ROS se vería aumentada en los embriones expuestos a MPTP en relación con el grupo control y con el grupo expuesto a MPTP y a un posible fármaco antioxidante.

Además, según Dong et al (26), tras aplicar MPTP también se puede observar un aumento de la enzima superóxido dismutasa cuya función es la de disminuir la cantidad de ROS evitando así el daño celular.

Estos dos hallazgos nos indican que, al aplicar MPTP sobre los embriones, se observa un aumento del estrés oxidativo en el organismo ya que tanto ROS como SOD se encuentran elevadas. Este estrés oxidativo provocaría daño celular y, con ello, la degeneración o destrucción neuronal. Este efecto es el mismo que se puede observar en la EP ya que hay un estado de estrés oxidativo y neurodegeneración, como ocurre al añadir MPTP.

#### 10.1.3. La expresión de Pink1 / Parkin

PINK1 y PARKIN son dos enzimas que participan en el proceso de mitofagia mitocondrial mediante el cual los fragmentos mitocondriales disfuncionales son eliminados. Las mutaciones en estos genes se han estudiado en la EP ya que provocan un acúmulo de mitocondrias defectuosas, que no son capaces de

desarrollar correctamente su función, provocando un aumento de ROS que, a su vez, provocaría daño celular (15).

En 4 de los 14 artículos (19, 21, 27 y 29), se estudia la expresión de PINK1/PARKIN al exponer los embriones de pez cebra a MPTP. En tres de ellos, se puede observar un aumento en los niveles tanto de PARK1 como de PARKIN, en respuesta al aumento del daño mitocondrial y el aumento de ROS producido por el MPTP. Por el contrario, según Díaz-Casado et al (29), se observa una disminución tanto en los niveles de PARKIN como en los de PINK1, bloqueando así el proceso de regulación mitocondrial y, con ello, aumentando el número de mitocondrias defectuosas y las cantidades de ROS.

Por tanto, el MPTP provoca una alteración de PARK1 y PARKIN. En la EP se ha estudiado la afectación de estas dos enzimas en la fisiopatología de la enfermedad, aunque según lo observado no podemos concluir que el modelo de MPTP reproduzca fielmente ese hecho, ya que hay discordancia en los resultados obtenidos. En ambos casos, se objetiva un aumento de mitocondrias disfuncionales que, a su vez, provocan un aumento de ROS. Sin embargo, este modelo no concluye si existe un aumento o una disminución de PARK1 y PARKIN en el proceso.

#### 10.1.4. Marcadores de neuro-inflamación

En la patogénesis de la EP, se ha visto que la neuro-inflamación es una de las características anatomopatológicas más importantes. Según Pavón Fuentes et al. (16), los estudios de imagen in vivo usando tomografía por emisión de positrones (PET), muestran que los pacientes con EP tienen un incremento significativo de los marcadores de neuro-inflamación. Por esta razón, se puede observar un aumento de algunas proteínas inflamatorias como iNOS.

En el artículo de Díaz-Casado et al (29) se realiza el estudio de la cantidad de iNOS en el modelo de MPTP. En este trabajo se puede observar un aumento muy significativo de este, lo que concuerda con la característica anatomopatológica descrita anteriormente.

Según lo visto anteriormente, el MPTP provocaría el aumento de proteínas proinflamatorias como ocurre en la EP, por lo que, podría ser un buen modelo de esta enfermedad.

Cabe destacar, que esta característica únicamente se estudia en un artículo de esta revisión (29) por lo que se debe ser cauto a la hora del análisis de estos datos.

#### 10.1.5. Concentraciones de acetilcolina

En la EP, el daño en el sistema dopaminérgico es la principal característica fisiopatológica de la enfermedad. Sin embargo, se ha visto como, unido a dicho daño dopaminérgico, también existe una alteración colinérgica alterada, según Hagino et al (17). La enzima acetilcolinesterasa (AChE), se encarga del proceso de degradación de la acetilcolina. Cuando dicha enzima se bloquea, no se degrada la acetilcolina quedando ésta libre y dando lugar a la disfunción celular (Cansiz et al (19)). Por ello, uno de los posibles tratamientos sintomáticos en la EP inicial según la SEN (3) son los fármacos anticolinérgicos, los cuales pueden tener efecto sobre los temblores.

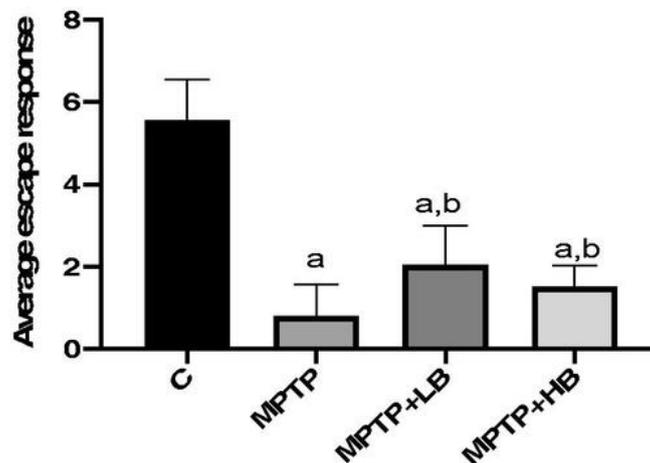
En uno de los artículos se evalúan los cambios en los niveles de acetilcolina en el modelo de la EP con MPTP (Cansiz et al (19)). En este trabajo se puede observar como el MPTP provoca una disminución sustancial de la AChE y, lo que aumenta las cantidades de acetilcolina, mimetizando una de las características producidas en la EP.

Por ello, vemos como el MPTP puede reproducir las consecuencias de una disminución de AChE en la EP, aunque, como en la característica anterior, al únicamente estudiarse en un artículo de la revisión los resultados deben ser estudiados con cautela.

### 10.1.6. Actividad motora

Los cuatro síntomas motores principales de la EP son bradicinesia, rigidez muscular, temblor de reposo e inestabilidad postural. Podemos decir por tanto que la disfunción motora es el principal síntoma que se puede observar en la EP.

En varios de los artículos de esta revisión se evalúa como el MPTP afecta a la actividad motora mediante el análisis de la locomoción de los peces, ya sea por su velocidad, por su distancia recorrida, o por el tiempo transcurrido en superar una zona delimitada. En los resultados de todos ellos se observa una disminución muy significativa de la actividad motora de los peces, independientemente de la forma en la cual se realice ese estudio.



*Figura 8. Gráfica la disminución de la frecuencia de escape promedio al aplicar MPTP según Üstündag et al (21)*

El modelo con MPTP produce alteraciones motoras en el 100% de los casos. Por ello, representa los síntomas motores que se producen en la EP, los cuales son un elemento muy característico y limitante de los pacientes que la padecen.

Cabe destacar que, además de las características vistas en el modelo con MPTP, se han estudiado otra serie de cambios que se han producido en los sujetos a estudio los cuales proporcionan información acerca de la toxicidad producida del MPTP o las posibles variaciones morfológicas que este produce.

La disminución en las tasas de eclosión o la aparición de estasis morfológico o edema pericárdico en el estudio morfológico de los embriones (21) son algunos de los resultados que se obtienen en el estudio del modelo con MPTP.

En algunos artículos, se investigan moléculas distintas a las mencionadas en la revisión, como se evidencia en el artículo (22). Estas moléculas desempeñan funciones similares o complementarias a las previamente descritas, y su elección varía según el artículo en cuestión. Por lo tanto, se ha optado por seleccionar aquellas moléculas que son comunes en varios de los estudios y que permiten identificar las características de la enfermedad de Parkinson en el modelo con MPTP.

Tras el estudio de todas estas características, podemos concluir que el MPTP aplicado sobre embriones de pez cebra, es un buen modelo para la modelización de la EP ya que, en él, podemos observar las características principales de la enfermedad y podemos estudiar los diferentes cambios o alteraciones que sufren al aplicar diferentes condiciones experimentales.

Respecto a la rotenona, únicamente el trabajo de Üstündag et al (30) cumplía los criterios de inclusión necesarios para el estudio de la EP en embriones de pez cebra. En dicho artículo únicamente se pueden valorar las tasas de eclosión y las alteraciones morfológicas dentro de las cuales podemos observar edema pericárdico, hemorragia en la curvatura dorsal y espinal y malformación de la cabeza. Únicamente podrían resultar de interés la malformación de la cabeza y la malformación espinal, ya que son las únicas alteraciones que se dan sobre el sistema nervioso.

Según esta revisión, y en base al único artículo seleccionado, no podemos sacar conclusiones definitivas sobre el uso de la rotenona como neurotoxina que modele la EP en embrión de pez cebra.

En conclusión, el embrión de pez cebra puede servir como modelo intermedio de la enfermedad, ya que, puede permitir el estudio de la EP en un organismo más complejo que una célula y que nos sirva de transición hacia modelos más complejos como sería un mamífero como el ratón. Por su parte, el MPTP es un compuesto adecuado para el estudio de la enfermedad, ya que induce las

principales características de la EP en el sujeto. En relación a la rotenona, en esta revisión no se han alcanzado resultados concluyentes.

## **10.2. Limitaciones del estudio**

A pesar de las conclusiones de interés descritas en esta revisión sistemática, este estudio presenta diferentes limitaciones.

El uso de embriones de pez cebra facilita la exposición a neurotoxinas, pero limita el estudio a ciertas características sólo durante las primeras 72 horas post fertilización (hpf). Sin embargo, es necesario que los individuos sean expuestos a estas sustancias durante un periodo prolongado, ya que a medida que el pez cebra madura, se pueden detectar diferentes alteraciones y estudiar diversas características que resultan difíciles de analizar en etapas tempranas. Por ejemplo, la locomoción se puede estudiar a las 72 hpf, pero es a partir de las 120 hpf cuando se puede realizar un análisis completo y detallado, debido al crecimiento y desarrollo suficiente del organismo. Lo mismo sucede con las relaciones sociales, que son difíciles de estudiar a las 72 hpf, requiriendo un mayor desarrollo de los individuos para un examen adecuado. En esta revisión únicamente empleamos organismos hasta 72 hpf ya que, como se comenta en la introducción, a partir de las 72 hpf los peces cebra ya son considerados larvas.

Aunque el pez cebra puede ser utilizado como un modelo experimental para estudiar la EP, es importante tener en cuenta que las diferencias entre los peces cebra y los mamíferos pueden afectar la representatividad del modelo para la enfermedad humana. Las características neuroanatómicas, los circuitos cerebrales y los mecanismos moleculares pueden variar entre estas especies. Por lo tanto, los resultados obtenidos al estudiar la EP en el pez cebra pueden no ser directamente extrapolables a los mamíferos superiores.

Una limitación adicional son los tipos de estudios experimentales empleados. La mayoría de ellos se centran en la investigación de posibles moléculas protectoras o reparadoras del daño causado por las neurotoxinas. Estos estudios se enfocan en características específicas relevantes para el análisis en cuestión, lo que

puede limitar la consideración de otros aspectos que podrían ser relevantes al desarrollar un modelo integral.

Es importante destacar que, en el proceso de revisión y selección de artículos, así como en la evaluación de la calidad y los sesgos, y la extracción de datos, ha participado únicamente una persona. Esto puede originar diferentes sesgos o limitaciones en la revisión de los estudios.

Al tratarse de un estudio experimental, la información es recogida y analizada por un grupo de investigadores los cuales pueden cometer errores en dicho análisis e, incluso, pueden introducir sesgos en su estudio.

Por último, de entre los artículos incluidos en esta revisión, los marcadores de análisis utilizados difieren entre ellos por lo que podría ser necesaria una mayor estandarización de los resultados obtenidos con el objetivo de obtener un mejor modelo de EP y con más posibilidades de extrapolación a organismos mamíferos superiores.

## **11. Conclusiones**

La EP es altamente prevalente en la actualidad y aún se desconocen completamente sus mecanismos. En la investigación, se utilizan el MPTP y la rotenona como neurotoxinas para generar modelos de EP en animales. Entre los modelos animales utilizados, el pez cebra se ha convertido en un organismo de estudio para la generación de la enfermedad. El objetivo de esta revisión fue analizar los modelos de EP generados en embriones de pez cebra utilizando MPTP y rotenona como neurotóxicos.

El MPTP, como neurotoxina, tiene la capacidad de simular diferentes características propias de la EP. En la revisión, se han estudiado principalmente dos características: la pérdida de neuronas dopaminérgicas y la disminución de la actividad motora. Estas dos características representan la base fisiopatológica de la enfermedad y se observan de manera notable en el modelo de pez cebra embrionario, especialmente la pérdida neuronal.

Además de estas características, también se han observado otros cambios como el aumento del estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y el incremento de marcadores de neuro-inflamación, los cuales también se han asociado con la EP.

El modelo de embrión de pez cebra permite generar y visualizar estas características de manera más sencilla, lo que facilita su uso en investigación y la posibilidad de extrapolar los resultados obtenidos a modelos mamíferos superiores más parecidos al ser humano.

En conclusión, el modelo de EP en embriones de pez cebra generado mediante el uso de MPTP es una buena herramienta para el estudio de la enfermedad. Permite la visualización y análisis de las principales características, lo cual podría tener una gran importancia para futuras investigaciones en este campo.

En la revisión realizada, no se encontraron datos concluyentes que respalden el uso de rotenona como neurotoxina para generar un modelo de EP en embriones de pez cebra. Los análisis sólo mostraron alteraciones morfológicas que no son específicas de la EP. Por lo tanto, según los resultados de esta revisión, no se considera que el modelo de EP en embriones de pez cebra generado con rotenona sea adecuado, y se prefiere utilizar MPTP como neurotoxina en su lugar.

## 12. Bibliografía

1. Raza C, Anjum R, Shakeel N ul A. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sciences*. Junio de 2019;226:77-90.
2. Marogianni C, Sokratous M, Dardiotis E, Hadjigeorgiou GM, Bogdanos D, Xiromerisiou G. Neurodegeneration and inflammation—an interesting interplay in parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(22).
3. Balestrino R, Schapira AHV. Parkinson disease. *European Journal of Neurology*. 2020;27(1).
4. Sociedad Española de Neurología. Guía oficial de práctica clínica en la enfermedad de Parkinson 2016 [documento en línea]. Madrid: Sociedad Española de Neurología; 2016. Disponible en: [https://www.sen.es/pdf/guias/Guia\\_oficial\\_de\\_practica\\_clinica\\_en\\_la\\_enfermedad\\_de\\_Parkinson\\_2016.pdf](https://www.sen.es/pdf/guias/Guia_oficial_de_practica_clinica_en_la_enfermedad_de_Parkinson_2016.pdf)
5. Martínez-Fernández. R, Gasca-Salas C. C, Sánchez-Ferro Á, Ángel Obeso J. ACTUALIZACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON. *Revista Médica Clínica Las Condes*. Mayo de 2016;27(3):363-79.
6. Barnhill LM, Murata H, Bronstein JM. Studying the Pathophysiology of Parkinson's Disease Using Zebrafish. *Biomedicines*. 7 de julio de 2020;8(7):197.
7. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*. julio de 1995;203(3):253-310.
8. Valina Gerpe C. El pez cebra (*Danio rerio*) como organismo modelo para el estudio del Síndrome Alcohólico Fetal [tesis de licenciatura]. A Coruña: Universidad de A Coruña; 2020. Disponible en: [https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/27204/ValinaGerpe\\_Claudia\\_TFG\\_2020.pdf](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/27204/ValinaGerpe_Claudia_TFG_2020.pdf)

9. Cuenca Alcañiz J. "Modelos animales de enfermedad de Parkinson [tesis de maestría]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2021. Disponible en: [https://eprints.ucm.es/id/eprint/49156/1/JAVIER%20CUENCA%20ALCA%C3%91IZ%20\(1\).pdf](https://eprints.ucm.es/id/eprint/49156/1/JAVIER%20CUENCA%20ALCA%C3%91IZ%20(1).pdf)
10. Du Y, Guo Q, Shan M, Wu Y, Huang S, Zhao H, et al. Spatial and Temporal Distribution of Dopaminergic Neurons during Development in Zebrafish. *Front Neuroanat* [Internet]. 28 de noviembre de 2016;10. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2016.00115/full>
11. Barnhill LM, Murata H, Bronstein JM. Studying the Pathophysiology of Parkinson's Disease Using Zebrafish. *Biomedicines*. 7 de julio de 2020;8(7):197.
12. Menke AL, Spitsbergen JM, Wolterbeek APM, Woutersen RA. Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish. *Toxicol Pathol*. agosto de 2011;39(5):759-75.
13. Lin CY, Tseng HC, Chu YR, Wu CL, Zhang PH, Tsai HJ. Cerebroventricular Injection of Pgk1 Attenuates MPTP-Induced Neuronal Toxicity in Dopaminergic Cells in Zebrafish Brain in a Glycolysis-Independent Manner. *IJMS*. 8 de abril de 2022;23(8):4150.
14. Hooijmans CR, Rovers MM, De Vries RB, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol*. diciembre de 2014;14(1):43.
15. Stolz A, Dikic I. Elusive mitochondrial connection to inflammation uncovered. *Nature*. septiembre de 2018;561(7722):185-6.
16. Pavón Fuentes N, Lorigados Pedre L. Neuroinflamación y Enfermedad de Parkinson. *Rev Panorama. Cuba y Salud* [Internet]. 2019; 14(3):44-49. Disponible en: <http://www.revpanorama.sld.cu/index.php/rpan/article/view/>

17. Hagino Y, Kasai S, Fujita M, Setogawa S, Yamaura H, Yanagihara D, et al. Involvement of Cholinergic System in Hyperactivity in Dopamine-Deficient Mice. *Neuropsychopharmacol.* abril de 2015;40(5):1141-50.
18. Wang L, Sheng W, Tan Z, Ren Q, Wang R, Stoika R, et al. Treatment of Parkinson's disease in Zebrafish model with a berberine derivative capable of crossing blood brain barrier, targeting mitochondria, and convenient for bioimaging experiments. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.* noviembre de 2021;249:109151.
19. Cansız D, Ustundag UV, Unal I, Alturfan AA, Emekli-Alturfan E. Morphine attenuates neurotoxic effects of MPTP in zebrafish embryos by regulating oxidant/antioxidant balance and acetylcholinesterase activity. *Drug and Chemical Toxicology.* 2 de noviembre de 2022;45(6):2439-47.
20. Duan WJ, Liang L, Pan MH, Lu DH, Wang TM, Li SB, et al. Theacrine, a purine alkaloid from kucha, protects against Parkinson's disease through SIRT3 activation. *Phytomedicine.* octubre de 2020;77:153281.
21. Üstündağ FD, Ünal İ, Cansız D, Üstündağ ÜV, Subaşı HK, Alturfan AA, et al. 3-Pyridinylboronic acid normalizes the effects of 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure in zebrafish embryos. *Drug and Chemical Toxicology.* 4 de marzo de 2022;45(2):947-54.
22. Zhao Y, Han Y, Wang Z, Chen T, Qian H, He J, et al. Rosmarinic acid protects against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurotoxicity in zebrafish embryos. *Toxicology in Vitro.* Junio de 2020;65:104823.
23. Guo B, Xu D, Duan H, Du J, Zhang Z, Lee SM, et al. Therapeutic Effects of Multifunctional Tetramethylpyrazine Nitron on Models of Parkinson's Disease *in Vitro* and *in Vivo*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin.* 2014;37(2):274-85.

24. Lam CS, Korzh V, Strahle U. Zebrafish embryos are susceptible to the dopaminergic neurotoxin MPTP. *European Journal of Neuroscience*. marzo de 2005;21(6):1758-62.
25. Zhu W, Fan Y, Li Y, Peng L, Li Y, Yan F, et al. Hybridization of amantadine with gardenamide A enhances NMDA antagonism and in vivo anti-PD effects. *Bioorganic Chemistry*. enero de 2023;130:106223.
26. Dong H, Mao L, Bai C, Ye K, Wu H, Lei Y, et al. Characterization of Developmental Neurobehavioral Toxicity in a Zebrafish MPTP-Induced Model: A Novel Mechanism Involving Anemia. *ACS Chem Neurosci*. 6 de julio de 2022;13(13):1877-90.
27. Hu Z ying, Chen B, Zhang J pu, Ma Y yuan. Up-regulation of autophagy-related gene 5 (ATG5) protects dopaminergic neurons in a zebrafish model of Parkinson's disease. *Journal of Biological Chemistry*. noviembre de 2017;292(44):18062-74.
28. Yao L, Peng SX, Xu YD, Lin SL, Li YH, Liu CJ, et al. Unexpected Neuroprotective Effects of Loganin on 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Induced Neurotoxicity and Cell Death in Zebrafish: Neuroprotection of Loganin Against MPTP Toxicity. *J Cell Biochem*. marzo de 2017;118(3):615-28.
29. Díaz-Casado ME, Lima E, García JA, Doerrier C, Aranda P, Sayed RK, et al. Melatonin rescues zebrafish embryos from the parkinsonian phenotype restoring the parkin/PINK1/DJ-1/MUL1 network. *J Pineal Res*. agosto de 2016;61(1):96-107.
30. Üstündağ FD, Ünal İ, Üstündağ ÜV, Cansız D, Beler M, Karagöz A, et al. 3-Pyridinylboronic Acid Ameliorates Rotenone-Induced Oxidative Stress Through Nrf2 Target Genes in Zebrafish Embryos. *Neurochem Res*. junio de 2022;47(6):1553-64.

**Anexo 1.** Tabla de análisis SYRCLE's RoB sobre el riesgo de sesgos de los artículos incluidos en la revisión.

		18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
<b>Sesgo</b>	Selección	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	
	Selección	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	
	Selección	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	
	Rendimiento	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Sí	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Poco claro	Sí	Poco claro	Sí	No
	Rendimiento	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
	Detección	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
	Detección	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
	Desgaste	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Sí
	Reporte	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí
	Otros	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí

- > Cada número representa el artículo correspondientemente citado en la bibliografía.
- > Ha destacar que cuando no se encuentra información detallada acerca del sesgo a estudio se cataloga como “no” en la respuesta a la pregunta.

**Anexo 2.** Tabla de extracción de datos de los artículos incluidos en la revisión

Título	Autor, fecha y país	Tipo de estudio	Descripción muestra	Exposición / Intervención	Resultados del estudio
<p><b>Treatment of Parkinson's disease in Zebrafish model with a berberine derivative capable of crossing blood brain barrier, targeting mitochondria, and convenient for bioimaging experiments</b></p>	<p>Wang et al. China Noviembre 2021</p>	<p>Estudio preclínico en animales</p>	<p>Grupo de embriones de pez cebra seleccionados a las 4 hpf (horas post fertilización) y tratados con 50 <math>\mu\text{M}</math> de MPTP en su fase de larva entre las 24 y las 72 hpf. Durante ese tiempo se añadieron 8 <math>\mu\text{M}</math> de un derivado de la berberina (BBRP).</p>	<p>Sobre la muestra se realizó una evaluación de la longitud de las neuronas dopaminérgicas marcadas con GFP a las 72 hpf.</p>	<p>Se evidencia una disminución de longitud superior al 20% en comparación con el grupo de control, tanto en el grupo expuesto al MPTP como en el expuesto a la molécula BBRP.</p>
<p><b>Morphine attenuates neurotoxic effects of MPTP in zebrafish embryos by regulating oxidant/antioxidant balance and acetylcholinesterase activity</b></p>	<p>Cansiz et al. Turquía Abril 2021</p>	<p>Estudio preclínico en animales</p>	<p>Grupo de embriones de pez cebra divididos en cuatro grupos: un grupo control, un grupo expuesto a MPTP 800 <math>\mu\text{M}</math>, un grupo expuesto a MPTP 800 <math>\mu\text{M}</math> + morfina 100 <math>\mu\text{M}</math> y un cuarto grupo expuesto a MPTP 800 <math>\mu\text{M}</math> + morfina 200 <math>\mu\text{M}</math>. Los embriones fueron expuestos a dichas sustancias a las 24 hpf.</p>	<p>Sobre la muestra, se realizó un estudio de las tasas de eclosión, la locomoción, actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y expresión de PINK1 en la muestra empleada respecto al grupo control y al grupo expuesto a la molécula reversora de la actividad del MPTP. Este estudio se realizó entre las 24 hpf y las 92 hpf.</p>	<p>Se observa una disminución en las tasas de eclosión, una disminución de la locomoción, una disminución de la actividad de la AChE y un aumento en la expresión de PINK en el grupo expuesto a MPTP.</p>

Título	Autor, fecha y país	Tipo de estudio	Descripción muestra	Exposición / Intervención	Resultados del estudio
<p><b>Theacrine, a purine alkaloid from kucha, protects against Parkinson's disease through SIRT3 activation</b></p>	<p>Duan et al China Octubre 2020</p>	<p>Estudio preclínico en animales</p>	<p>Grupo de embriones que a las 24 hpf fueron divididos en 4 grupos de 30 ejemplares según la sustancia a la que fueran a ser expuestos. Los grupos eran control, MPTP (40 µg/ml), teacrina (1 mM + MPTP) y depranil (20 µg/ml + MPTP), este último como control positivo.</p>	<p>Sobre la muestra, se pudo estudiar el número de neuronas dopaminérgicas presentes, así como la capacidad de natación de los embriones de pez cebra expuestos a MPTP en comparación con los otros tres grupos.</p>	<p>Se observa una reducción en el número de neuronas dopaminérgicas y un aumento en el tiempo necesario para escapar del área delimitada en la prueba de natación en el grupo expuesto a MPTP en relación con el resto de los grupos.</p>
<p><b>3-Pyridinylboronic acid normalizes the effects of 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure in zebrafish embryos</b></p>	<p>Üstündag et al. Julio 2020 Turquía</p>	<p>Estudio preclínico en animales</p>	<p>Grupo de embriones de pez cebra hasta 72 hpf en una solución madre divididos en 4 grupos: control, expuestos a MPTP (800 µM), expuestos a MPTP + dosis baja de ácido 3-piridinilborónico (50 µM) (MPTP + LB) y MPTP + dosis alta (100 µM) de ácido 3-piridinilborónico (MPTP + HB) en placas de pocillos.</p>	<p>Sobre la muestra, se pudo estudiar las tasas de eclosión, la capacidad de locomoción y la expresión de PINK1 en los embriones de pez cebra expuestos a MPTP en comparación con los otros grupos.</p>	<p>En los resultados obtenidos se observa una disminución de las tasas de eclosión, una disminución notable de la capacidad locomotora y un aumento notable de PINK1 embriones expuestos a MPTP en comparación con los otros grupos.</p>

Título	Autor, fecha y país	Tipo de estudio	Descripción muestra	Exposición / Intervención	Resultados del estudio
<p><b>Rosmarinic acid protects against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurotoxicity in zebrafish embryos</b></p>	<p>Zhao et al Junio 2020 China</p>	<p>Estudio preclínico en animales</p>	<p>Grupo de embriones de pez cebra los cuales, a las 24 hpf, fueron distribuidos en seis pocillos con treinta embriones cada uno para ser sometidos a 50µM de MPTP, 50 µM de MPTP + 10 µM de RA y 50 µM de MPTP + 20 µM de RA. Tras esto se evaluaron los resultados entre las 24 hpf y las 120 hpf.</p>	<p>Sobre la muestra, se pudo estudiar el número de neuronas dopaminérgicas al marcar la tirosina hidroxilasa (TH) mediante inmunohistoquímica y las especies reactivas del oxígeno (ROS).</p>	<p>En los resultados se observa una disminución significativa del número de neuronas TH positivas y un aumento de ROS en los grupos expuestos a MPTP en comparación con el resto de los grupos.</p>
<p><b>Therapeutic effects of multifunctional tetramethylpyrazine nitron on models of Parkinson's disease in vitro and in vivo</b></p>	<p>Guo et al China Diciembre 2013</p>	<p>Estudio preclínico en animales</p>	<p>Grupo de embriones de pez cebra recogidos y decorionizados en las primeras 24 hpf. Tras esto, se reparten en 12 pocillos con 20 embriones cada uno y se les administra 200 µM de MPTP, 200 µM de MPTP + TBN y TMP o control positivo.</p>	<p>La muestra se estudia a las 72 hpf para observar el número de neuronas dopaminérgicas TH positivas.</p>	<p>En los resultados se puede observar una disminución del número de neuronas dopaminérgicas positivas en el grupo expuesto a MPTP en comparación con el grupo control y el resto de los grupos.</p>

Título	Autor, fecha y país	Tipo de estudio	Descripción muestra	Exposición / Intervención	Resultados del estudio
<p><b>Zebrafish embryos are susceptible to the dopaminergic neurotoxin MPTP</b></p>	<p>Lam et al Francia Marzo 2005</p>	<p>Estudio preclínico en animales</p>	<p>Grupo de embriones de pez cebra divididos en dos grupos: uno control y otro expuesto a 800 µm de MPTP a las 24 hpf.</p>	<p>El grupo expuesto se analizó a las 48 y a las 72 hpf y en él se estudia: el número de neuronas dopaminérgicas y la especificidad del MPTP por las mismas y la respuesta motora en comparación con el grupo control.</p>	<p>En los resultados se puede observar una reducción del número de neuronas dopaminérgicas, además de la especificidad del MPTP por las mismas, y una disminución de la respuesta motora en los individuos expuestos a MPTP.</p>
<p><b>Hybridization of amantadine with gardenamide A enhances NMDA antagonism and in vivo anti-PD effects</b></p>	<p>Zhu et al. China Enero 2023</p>	<p>Estudio preclínico en animales</p>	<p>Grupo de embriones de pez cebra que a las 24 hpf fueron divididos en 7 grupos con 30 embriones por grupo. Cada uno de ellos fue nombrado control, MPTP (40 µg/ml), SeI (0.1 mM Seleginina + 40 µg/ml MPTP), amantadina (ATD) (50 µM ATD + 40 µg/ml MPTP), Gardenamida A (GA) (50 µM GA + 40 µg/ml MPTP), ATD/GA (50 µ).</p>	<p>Los embriones fueron analizados a las 72 hpf y, en ellos, se puede estudiar la actividad locomotora y el número de neuronas dopaminérgicas en embriones de pez cebra de cada uno de los grupos.</p>	<p>En los resultados se puede observar una clara alteración de la locomoción ya que, los embriones expuestos a MPTP, tardan más tiempo en salir del área seleccionada. Además, se puede observar una disminución en el número de neuronas dopaminérgicas en el grupo expuesto únicamente a MPTP con relación al grupo control y a los grupos con las posibles sustancias reversoras de su efecto.</p>

Título	Autor, fecha y país	Tipo de estudio	Descripción muestra	Exposición / Intervención	Resultados del estudio
<p><b>Characterization of Developmental Neurobehavioral Toxicity in a Zebrafish MPTP-Induced Model: A Novel Mechanism Involving Anemia</b></p>	<p>Dong et al China Julio 2022</p>	<p>Estudio preclínico en animales</p>	<p>Grupo de embriones de pez cebra tanto de línea AB como transgénicos expuestos a una dosis de 1 <math>\mu</math>M de MPTP que resulta efectiva para provocar neurotoxicidad, pero no teratogenia.</p>	<p>Los embriones fueron analizados a diferentes tiempos desde las 48 a las 120 hpf, aunque únicamente los analizamos hasta las 72 hpf. Se puede estudiar los cambios en la locomoción, la apoptosis celular cerebral, el estrés oxidativo y el número de neuronas dopaminérgicas que sufren los embriones de pez cebra expuesto a MPTP en comparación con el grupo control.</p>	<p>En los resultados obtenidos se puede observar un aumento tanto de la apoptosis celular como de los niveles de estrés oxidativo en el grupo expuesto a MPTP. Respecto a la locomoción, no se observan cambios significativos hasta las 72 hpf aunque posteriormente sí se pueden observar. El número de neuronas dopaminérgicas disminuye a las 72 hpf a nivel de la retina, aunque a nivel cerebral no se observan alteraciones significativas.</p>

Título	Autor, fecha y país	Tipo de estudio	Descripción muestra	Exposición / Intervención	Resultados del estudio
<p><b>Up-regulation of autophagy-related gene 5 (ATG5) protects dopaminergic neurons in a zebrafish model of Parkinson's disease</b></p>	<p>Hu et al China Noviembre 2017</p>	<p>Estudio preclínico en animales</p>	<p>Grupo de larvas de pez cebra expuestas a los 2 dpf a unas concentraciones de 100 y 200 <math>\mu</math>M de MPTP con respecto a un grupo control.</p>	<p>Los embriones se analizaron a los 3 dpf, en ellos, se puede observar el número de neuronas dopaminérgicas TH positivas y los niveles de PARK1 y PARKIN.</p>	<p>En los resultados, se observa una disminución de TH marcada con respecto al grupo control y que es más marcada en el grupo expuesto a 200 <math>\mu</math>M de MPTP. Además, se observa un aumento en los niveles de PARK1 y PARKIN respecto al grupo control.</p>
<p><b>Unexpected Neuroprotective Effects of Loganin on 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Induced Neurotoxicity and Cell Death in Zebrafish</b></p>	<p>Yao et al. China Septiembre 2016</p>	<p>Estudio preclínico en animales</p>	<p>Grupo de larvas de hasta 72 hpf divididas en 6 pocillos los cuales corresponden a control, MPTP, Loganina, MPTP + preLoganina y MPTP + Loganina.</p>	<p>En los diferentes grupos se puede estudiar el número de neuronas dopaminérgicas y la actividad locomotora de los sujetos expuestos a MPTP en comparación con el resto de los grupos.</p>	<p>En los resultados se puede observar una notable reducción de neuronas dopaminérgicas y, con respecto a la locomoción, una disminución tanto de la distancia recorrida como de la velocidad promedio en el grupo expuesto a MPTP.</p>

Título	Autor, fecha y país	Tipo de estudio	Descripción muestra	Exposición / Intervención	Resultados del estudio
<p><b>Melatonin rescues zebrafish embryos from the parkinsonian phenotype restoring the parkin/PINK1/DJ-1/MUL1 network</b></p>	<p>Díaz-Casado et al España Agosto 2016</p>	<p>Estudio preclínico en animales</p>	<p>Grupo de embriones decorionados a las 24 hpf y distribuidos aleatoriamente en placas de 24 pocillos con seis embriones por pocillo. Tras esto fueron divididos en 4 grupos: uno control, uno expuesto a 600 <math>\mu</math>M de MPTP, otro expuesto a 600 <math>\mu</math>M de MPTP + 0.2 <math>\mu</math>M de melatonina y un último expuesto a 600 <math>\mu</math>M de MPTP + 1 <math>\mu</math>m de melatonina.</p>	<p>Los embriones se analizaron a las 72 hpf y en ellos se puede estudiar la cantidad de óxido nítrico sintetasa (iNOS), la cantidad de neuronas dopaminérgicas, y la expresión de los genes responsables de la regulación de la degradación mitocondrial (PINK1 y PARKIN).</p>	<p>En los resultados se puede observar una disminución tanto en el número de neuronas dopaminérgicas TH positivas como en la expresión de los genes de regulación mitocondrial PINK1 y PARKIN en el grupo expuesto únicamente a MPTP. Por el contrario, se ve aumentado iNOS en el grupo expuesto a MPTP en comparación con el resto.</p>

Título	Autor, fecha y país	Tipo de estudio	Descripción muestra	Exposición / Intervención	Resultados del estudio
<p><b>3-Pyridinylboronic Acid Ameliorates Rotenone-Induced Oxidative Stress Through Nrf2 Target Genes in Zebrafish Embryos</b></p>	<p>Üstündag et al. Junio 2022 Turquía</p>	<p>Estudio preclínico en animales</p>	<p>Grupo de embriones sembrados en placas de pocillos divididos en seis grupos expuestos a rotenona (10 µg/l), dosis baja de ácido 3-piridinilborónico (100 µM), dosis alta de ácido 3-piridinilborónico (200 µM); rotenona + dosis baja de ácido 3-piridinilborónico (10 µg/l + 100 µM), rotenona + dosis alta de ácido 3-piridinilborónico (10 µg/l + 200 µM). Cada experimento se replicó 3 veces con 50 embriones por ensayo.</p>	<p>Los embriones se estudiaron a las 72 y a las 96 hpf aunque únicamente analizaremos los estudiados a las 72 hpf. En ellos se realiza un estudio comparativo, de morfología y eclosión de los grupos de peces cebra expuestos a rotenona y el resto de los grupos.</p>	<p>En los resultados se observan alteraciones morfológicas en el grupo expuesto a rotenona, y sus tasas de eclosión disminuyeron respecto al grupo control.</p>