

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**



**POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

Maestría en Ciencias Químicas  
Área de Bioquímica y Biología Molecular

---

**LABORATORIO DE NEUROQUÍMICA**

**Toxicidad con rotenona en el sistema  
dopaminérgico y su efecto en la conducta motora**

**T E S I S**

Presentada para obtener el Grado de  
Maestría en Ciencias Químicas  
en el Área de Bioquímica y Biología Molecular

**P R E S E N T A**

IBT. Alejandro González García

**DIRECTORAS**

**Dra. Liliana Martínez Mendieta**

Profesora e Investigadora, FCQ- BUAP

**Dra. María Isabel Martínez García**

Profesora e Investigadora, FCQ- BUAP

H. Puebla de Zaragoza a Noviembre de 2019



**BUAP**

**A QUIEN CORRESPONDA:**

Por este conducto la Comisión Revisora formada por el Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León, M.C. Félix Luna Morales, Dra. Tania Ávila Ruiz y la Dra. Adriana Berenice Silva Gómez, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada **“Toxicidad con rotenona en el sistema dopaminérgico y su efecto en la conducta motora”**, que presenta el alumno **Alejandro González García** para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los quince días del mes de octubre del año dos mil diecinueve.

**ATENTAMENTE**

Dr. Ilhuicamina Daniel Limón Pérez de León

M.C. Félix Luna Morales

Dra. Tania Ávila Ruiz

Dra. Adriana Berenice Silva Gómez



**CONACYT**

*Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología*

El sustentante del presente trabajo fue financiado

con el número de beca No: **618269**

Otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y

Tecnología durante el periodo 2017-2018

Los experimentos conductuales e inmunohistoquímicos se  
realizaron en el Laboratorio de Neurofarmacología bajo la

Dirección de

Dra. Isabel Martínez García y la

Dra. Liliana Martínez Mendieta

# INDICE

<b>Índice de figuras</b> .....	<b>i</b>
<b>Índice de tablas</b> .....	<b>i</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>ii</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>iv</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Enfermedad de Parkinson .....	1
1.2 Regulación del movimiento por medio de los ganglios basales .....	3
1.3 Modelos experimentales de la EP usando neurotóxicos .....	5
1.3.1 Modelo de toxicidad por 6-OHDA .....	5
1.3.2 Modelo de toxicidad por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina .....	5
1.3.3 Modelo de toxicidad por Rotenona .....	6
1.4 Rotenona .....	7
1.3 Modificaciones postraduccionales de la proteína .....	10
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>12</b>
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	<b>13</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
4.1 Objetivo general .....	13
4.2 Objetivos particulares .....	13
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
5.1 Diagrama de trabajo .....	14
5.2 Sujetos experimentales .....	15
5.3 Preparación de la rotenona .....	15
5.4 Administración de la rotenona .....	15
5.5 Modelo de campo abierto .....	16
5.6 Modelo de la pasarela .....	16
5.7 Obtención de tejido nervioso para inmunohistoquímica .....	17
5.8 Inmunohistoquímica .....	17
5.9 Análisis de imagen .....	18
5.10 Análisis estadístico .....	18
<b>VI. Resultados</b> .....	<b>20</b>
6.1 Efecto fisiológico producido por la administración de rotenona .....	20
6.2 Efecto de la administración de rotenona sobre la conducta motora .....	22
6.3 La administración de rotenona disminuye la inmunorreactividad de TH en estriado y SNpc .....	24
6.4 Efecto del tratamiento con rotenona sobre la inmunorreactividad de DAT y VMAT-2 en estriado .....	27
6.5 Efecto de la rotenona sobre la inmunorreactividad de la .....	

proteína $\alpha$ -Syn fosforilada en S129.....	30
<b>VII. . Discusión .....</b>	<b>32</b>
<b>VIII. Conclusión.....</b>	<b>38</b>
<b>IX. Perspectivas .....</b>	<b>38</b>
<b>X. Referencias .....</b>	<b>39</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. síntesis de dopamina.....	2
Figura 2. Las vías directas e indirectas de conexiones los ganglios basales.....	3
Figura 3. Estructura molecular de la rotenona.....	6
Figura 4. Mecanismo de toxicidad de la rotenona .....	7
Figura 5. Inhibición del complejo I mitocondrial .....	8
Figura 6. Modificaciones postraduccionales de la $\alpha$ -Syn .....	10
Figura 7. Evaluación de la motricidad por la prueba de la pasarela en ratones ....	16
Figura 8. Evaluación del peso y la temperatura ratones hembra (0.5 mg/kg) .....	20
Figura 9. Evaluación del peso y la temperatura ratones hembra (0.8 y 1 mg/kg). ..	21
Figura 10. Evaluación de la conducta motora por prueba de campo abierto .....	22
Figura 11. Efecto de la rotenona sobre la coordinación motora en prueba de la pasarela.....	23
Figura 12. Efecto de la rotenona en la inmunorreactividad de TH en el estriado ..	25
Figura 13. Efecto de la rotenona sobre la inmunorreactividad de TH en SNpc.....	26
Figura 14. Disminución de inmunorreactividad de DAT .....	28
Figura 15 Inmunorreactividad de VMAT-2.....	29
Figura 16 Efecto de la rotenona en la inmunorreactividad de $\alpha$ -Syn fosforilada en S129.....	30

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios usados en el experimento .....	18
---	----

## ABREVIATURAS

<b><math>\alpha</math>-Syn</b>	Alfa-sinucleína
<b>6-OHDA</b>	6-hidroxidopamina
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>CL</b>	Cuerpo de Lewy
<b>COMT</b>	Catecol O-metil transferasa
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DAAC</b>	Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos
<b>DAT</b>	Transportador de dopamina
<b>DAB</b>	Diaminobencidina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DOPAC</b>	Ácido 3,4-dihidroxifenil acético
<b>EP</b>	Enfermedad de Párkinson
<b>GB</b>	Ganglios basales
<b>GPe</b>	Globo pálido externo
<b>GPi</b>	Globo pálido interno
<b>GPX</b>	Glutación peroxidasa
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano
<b>HVA</b>	Ácido homovanílico
<b>MAO</b>	Monoamino oxidasa
<b>MPTP</b>	1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Dinucleótido de nicotinamida adenina
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenín di nucleótido reducido
<b>NGS</b>	Factor de crecimiento neuronal

<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido
<b>OH</b>	Radical hidroxilo
<b>PBS</b>	Buffer salino de fosfatos
<b>PGE</b>	Polietilenglicol
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNP</b>	Sistema nervioso periférico
<b>SNpc</b>	Sustancia nigra pars compacta
<b>SNr</b>	Sustancia Nigra pars reticulada
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>SSI</b>	Solución salina isotónica
<b>STN</b>	Núcleo Subtalámico
<b>TH</b>	Tirosina Hidroxilasa
<b>VL</b>	Tálamo ventro lateral
<b>VMAT-2</b>	Transportador vesicular de monoaminas de tipo 2

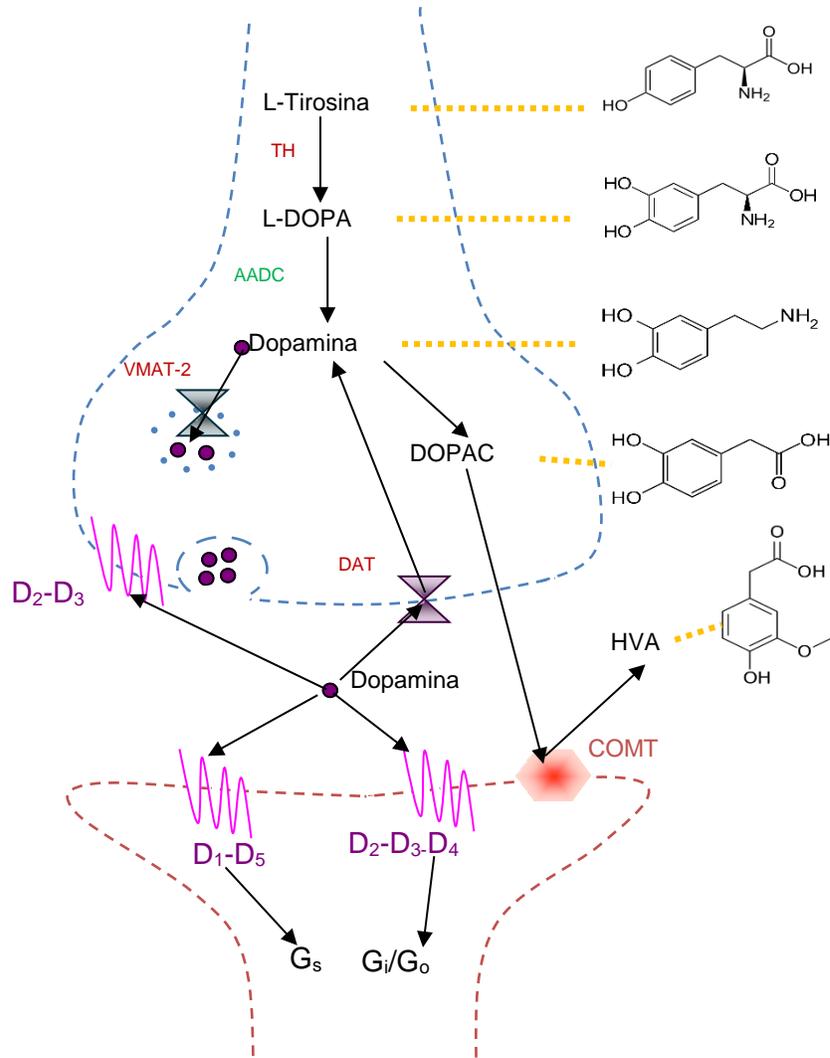
## Resumen

La rotenona es neurotóxico que permite evaluar diversos aspectos bioquímicos y conductuales de la Enfermedad de Parkinson. El modelo de rotenona genera controversia debido a que se reporta una alta variabilidad en el efecto que produce, esto puede ser producto de las condiciones utilizadas, tales como la vía de administración, dosis y cepa de roedor utilizada. El objetivo del presente estudio fue caracterizar un modelo de toxicidad con rotenona en el ratón hembra. Se utilizaron 3 grupos ratones hembra de la cepa CD-1 a los cuales se administró, 0.5, 0.8 y 1mg/kg de rotenona i.p. por 21, 7 y 7 días respectivamente. Se encontró que el peso de los ratones no varió en ninguno de los tratamientos. El grupo tratado con 0.8 mg/kg de rotenona, presentó hipertermia en los primeros 2 días de administración mientras que el grupo tratado con 1 mg/kg presentó hipotermia el tercer día de administración, ambos grupos tuvieron un comportamiento similar al del grupo vehículo a partir del día 4 y continuó hasta el final del tratamiento. La prueba de campo abierto mostró una tendencia a la disminución de la exploración dependiente de la dosis. Por otro lado, los ratones no presentaron diferencias en el tiempo promedio para concluir el recorrido en la prueba de la pasarela. Sin embargo, en el parámetro que mide la coordinación, se observó que el grupo tratado con 1 mg/kg de rotenona incrementó significativamente el número de errores cometidos. Las pruebas inmunohistoquímicas mostraron una disminución en la inmunorreactividad de tirosina hidroxilasa en el estriado y en la sustancia nigra pars compacta para los grupos tratados con 0.8 y 1 mg/kg. Por su parte el transportador de dopamina mostró una disminución en la inmunorreactividad del para el tratamiento de 0.5 mg/kg y el grupo tratado con 1 mg/kg de rotenona. El análisis inmunohistoquímico no mostró cambios en la inmunorreactividad del transportador vesicular de monoaminas de tipo 2. Finalmente se encontró que la administración de rotenona incrementó la inmunorreactividad de la proteína  $\alpha$ -Sinucleína fosforilada en S129. En conclusión, la administración crónica de rotenona altera la regulación de la síntesis y transporte de dopamina y modifica la conducta motora del ratón hembra CD-1, encontrando que la dosis a evaluar en futuros experimentos es de 1 mg/kg.

## I Introducción

### 1.1 Enfermedad de Parkinson

La Enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, que afecta entre el 1-3% de la población de adultos mayores de 60 años a nivel mundial (Martínez *et al.*, 2016). El 10% de los casos de EP son producidos por mutaciones genéticas familiares. Sin embargo, la mayoría de los casos son de causa desconocida denominados idiopáticos (Klein & Schlossmacher, 2007). Existe evidencia que muestra que el género es un factor de riesgo en la EP. La prevalencia de la EP en hombres es el doble que en mujeres, lo que demuestra la importancia de estudiar el dimorfismo del cerebro para diseñar terapias óptimas tanto para pacientes masculinos como femeninos de la EP (Gillies *et al.*, 2014). Las principales características fisiopatológicas de la EP son la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la Sustancia Nigra pars compacta (SNpc) y la acumulación de agregados proteicos, entre ellos la alfa-sinucleína ( $\alpha$ -syn), que forman los cuerpos de Lewy (CL). El número de neuronas dopaminérgicas en la SNpc varía entre las especies. Los seres humanos tienen alrededor de 220,000 neuronas dopaminérgicas, mientras que el ratón tiene entre 10,000 y 15,000 neuronas por cada hemisferio (Hamani & Lozano, 2003). Se ha encontrado que múltiples marcadores del sistema dopaminérgico se encuentran alterados en la EP. Existe una disminución de la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante de la velocidad de biosíntesis de dopamina (DA) (Tabrez *et al.*, 2012). Al igual, que el transportador de dopamina (DAT) que es el responsable de la recaptación de la DA desde el espacio sináptico, y el transportador de monoaminas vesiculares tipo 2 (VMAT-2) que dentro de las neuronas dopaminérgicas se encarga del empaquetamiento de la DA en vesículas sinápticas para su posterior liberación (Figura 1) los cuales también se encuentran disminuidos en la EP (Ritz *et al.*, 2009; Lohr & Miller, 2014). La EP se considera un desorden principalmente de tipo motor. Los síntomas característicos de la EP son la acinesia, la bradicinesia, el temblor en reposo así como la rigidez e inestabilidad postural entre otros (Moustafa *et al.*, 2016).



**Figura 1. Síntesis de dopamina.** Se muestra el proceso de síntesis de la dopamina desde la L-Tirosina, hasta la desnaturalización de esta, así como las enzimas principales que participan en el proceso de síntesis, recaptura y degradación de la dopamina y los receptores pre y postsinápticos. (TH) Tirosina Hidroxilasa, (AADC) L-Aminoácido aromático descarboxilasa, (DAT) Transportador de dopamina, (VMAT2) Transportador vesicular de monoaminas de tipo 2, (DOPAC) Ácido 3,4-Dihidroxfenilacético, (MAO) monoamino oxidasa, (COMT) Catecol O-metiltransferasa. Tomado y modificado de (Sharples *et al.*, 2014)

Los síntomas motores son producidos por la desregulación en los circuitos de los ganglios basales (GB) (Jones & Hirst, 2013).

## 1.2 Regulación del movimiento por medio de los ganglios basales (GB)

Los GB, son un conjunto de núcleos subcorticales encargados de múltiples tareas como es la regulación de las funciones motoras, cognitivas entre otras. Los 4 núcleos que forman los GB son el globo pálido, el núcleo subtalámico, la sustancia nigra y el neostriado. El globo pálido, está separado en el segmento interno (GPi) y en el segmento externo (GPe). Por otra parte, la sustancia nigra se divide en sustancia nigra dorsal y ventral, la parte dorsal comprende a la SNpc y la parte ventral a la sustancia nigra pars reticulata (Avila Luna, 2013). En el sistema de los GB se encuentran 3 tipos de neurotransmisores: GABA de tipo inhibitorio, Glutamato que presenta un efecto excitatorio y dopamina con un efecto dual.

La regulación del movimiento por parte de los GB se genera mediante la activación de movimientos voluntarios y la eliminación de movimientos involuntarios esto mediado por las vías directas e indirectas de los ganglios basales. La vía directa, encargada de la activación de los movimientos voluntarios, comienza mediante la entrada de señales excitatorias provenientes de la corteza y señales tanto excitatorias como inhibitorias provenientes de la SNpc al putamen, el cual libera GABA, inhibiendo a GPi y a la SNr, las cuales inhiben a VL, al inhibir el efecto de GPi y SNr incrementa la actividad de VL liberando Glutamato en la corteza lo produce el movimiento controlado. Por su parte, la vía indirecta es la encargada de la eliminación de los movimientos involuntarios. Al igual que la vía directa comienza entrada de señales tanto de la corteza como de la SNpc estimulando el putamen el cual libera GABA inhibiendo el GPe el cual, es el encargado de inhibir el STN, al inhibir GPe aumenta la actividad de STN liberando Glutamato activando GPi y la SNr los cuales inhiben mediante la liberación de GABA a VL, disminuyendo la liberación de Glutamato en la corteza evitando los movimientos involuntarios (Figura 2A). En la EP la liberación de DA de la SNpc al putamen disminuye induciendo un aumento en la actividad de GPi y la SNr por parte de la vía indirecta, esto conlleva a una inhibición mayor del tálamo provocando así un descenso en los niveles de Glutamato liberados a la corteza limitando así el movimiento voluntario (figura 2B) (Calabresi *et al.*, 2014).

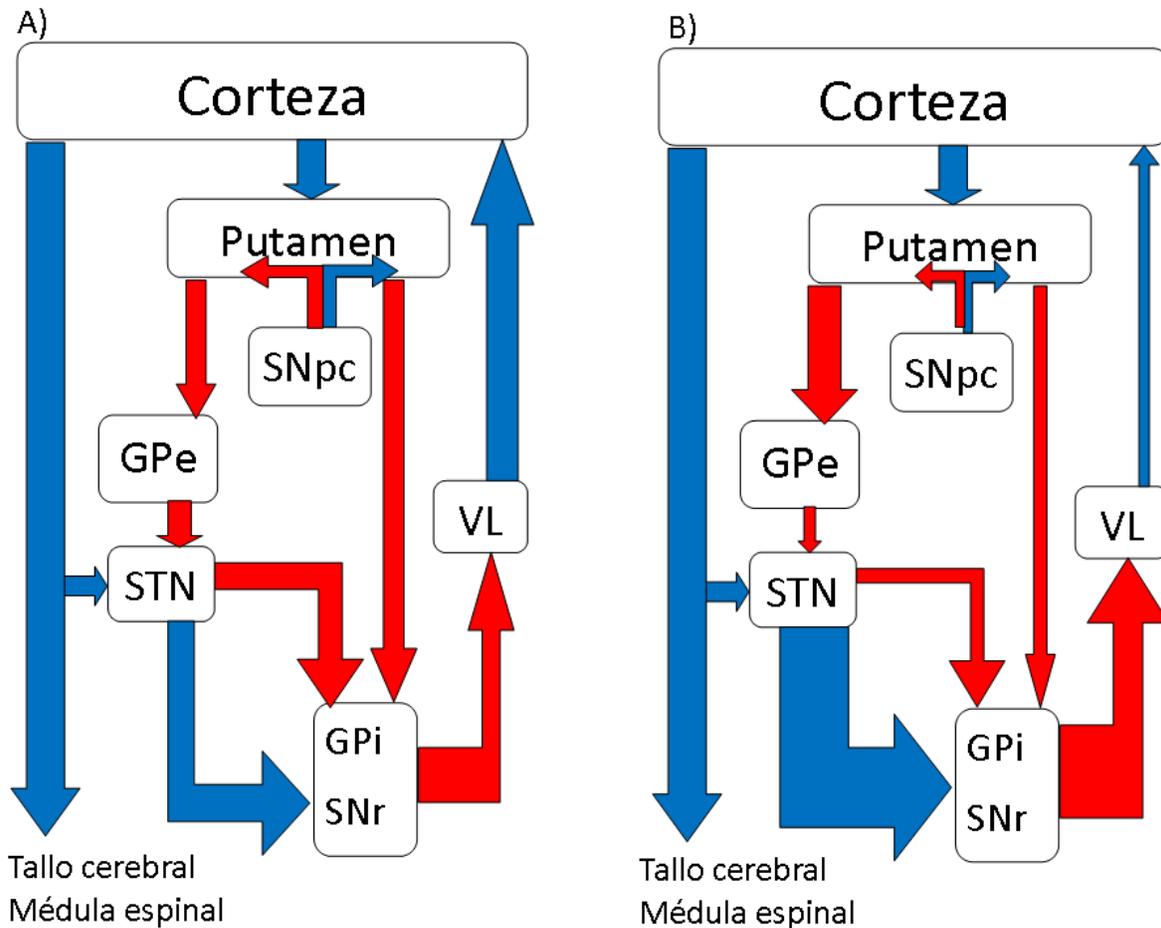


Figura 2. **Las vías directas e indirectas en los ganglios basales y la corteza.** En (a) la regulación de los ganglios basales en el cerebro sano, y en (b) la enfermedad de Parkinson. El grosor de las líneas indica el nivel de actividad. Las flechas azules representan conexiones excitatorias; Las flechas rojas representan conexiones inhibitorias. GPe, segmento externo del globo pálido; GPi, segmento interno del globo pálido; SNc, sustancia nigra pars compacta; SNr, substantia nigra pars reticulata; VL, núcleo ventrolateral del tálamo. Tomado y modificado de Jones and Jahanshahi 2013.

A pesar de que la EP es conocida principalmente como una enfermedad motora, es una patología compleja donde existen también síntomas no motores como ansiedad, apatía, depresión y alteraciones del sueño que causan un impacto mayor en la vida de los pacientes de EP (Frucht, 2004).

Los mecanismos que originan esta patología todavía no son claros, por lo cual, el desarrollo de modelos animales para su estudio han sido una herramienta invaluable para proponer nuevas terapéuticas farmacológicas.

### 1.3 Modelos experimentales de la EP usando neurotóxicos

Los modelos experimentales de la EP tienen como objetivo el estudiar los mecanismos de la enfermedad y probar posibles terapias y fármacos con un potencial clínico. Estos modelos se basan en la administración sistémica o local de neurotoxinas que pueden replicar la mayoría de las características patológicas y fenotípicas de la EP en mamíferos (Blandini y Armentero, 2012).

#### 1.3.1 Modelo de toxicidad por 6-OHDA

El modelo más utilizado en roedores es el de la 6-hidroxidopamina (6-OHDA), el cual se ha visto que tiene una selectividad a las neuronas catecolaminérgicas. La 6-OHDA comparte algunas similitudes estructurales con la DA y la noradrenalina (NE), esto le permite tener una afinidad a los transportadores DAT y el transportador de noradrenalina (NET). Debido a esta afinidad la 6-OHDA puede ingresar a las neuronas dopaminérgicas y noradrenérgicas para efectuar un daño en neuronas del sistema nervioso periférico y central (Bové *et al.*, 2005). El modelo de acción de la 6-OHDA es una combinación entre ROS y quinonas. La 6-OHDA administrada bilateralmente produce anomalías motoras que se atenúan mediante estimuladores los receptores dopaminérgicos (Rodríguez Díaz *et al.*, 2001).

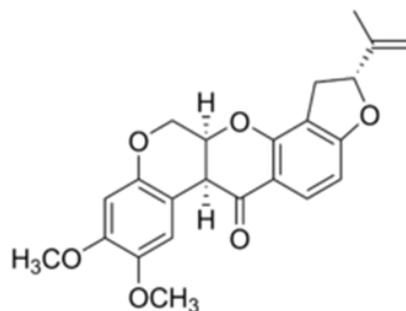
#### 1.3.2 Modelo de toxicidad por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)

El 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) es un bloqueador del complejo I mitocondrial de la cadena transportadora de electrones. EL MPTP fue sintetizado inesperadamente mediante la síntesis ilícita del 1-metil-4-fenil-4-propionpiperidina (MPPP) (Bové *et al.*, 2005). El MPTP causa daño a las neuronas

dopaminérgicas de la SNpc como se observa en la EP. Después de la administración sistémica de MPTP, su metabolito activo, MPP+, se acumula dentro de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, donde inhibe la producción de ATP y estimula la formación de radicales superóxido. Los radicales superóxido producidos reaccionan con el óxido nítrico (NO) para producir peroxinitrito, una especie altamente reactiva que daña los tejidos y daña las proteínas por oxidación y nitración. Esta nitración daña a proteínas como la TH afectando la síntesis de DA. Todos estos eventos conllevan a la muerte de neuronas dopaminérgicas (Przedborski *et al.*, 2000).

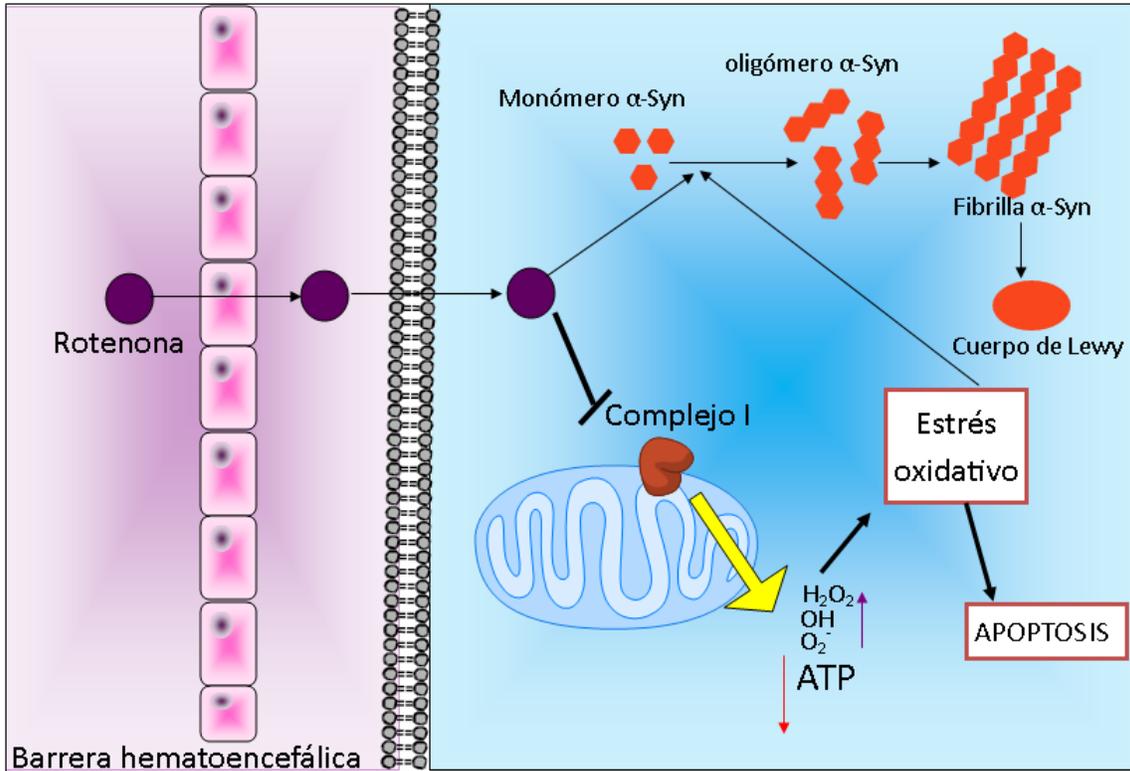
### 1.3.3 Modelo de toxicidad por Rotenona

Entre los modelos animales de la EP, la rotenona representa uno de los enfoques utilizados más recientemente. La rotenona es el miembro más potente de los rotenoides, una familia de compuestos citotóxicos naturales extraídos de varias partes de las plantas de leguminosa (Figura 3) (Tieu, 2011).



**Figura 3. Estructura molecular de la rotenona**

Este último modelo, tiene ventaja sobre los otros modelos, debido a que reproduce varias de las características fisiopatológicas de la EP, como la disfunción mitocondrial y la generación de agregados citoplasmáticos de  $\alpha$ -syn en las neuronas de la SNpc (Figura 4) (Martinez & Greenamyre, 2012), característica de daño en la EP, que no cumplen otros modelos clásicos.

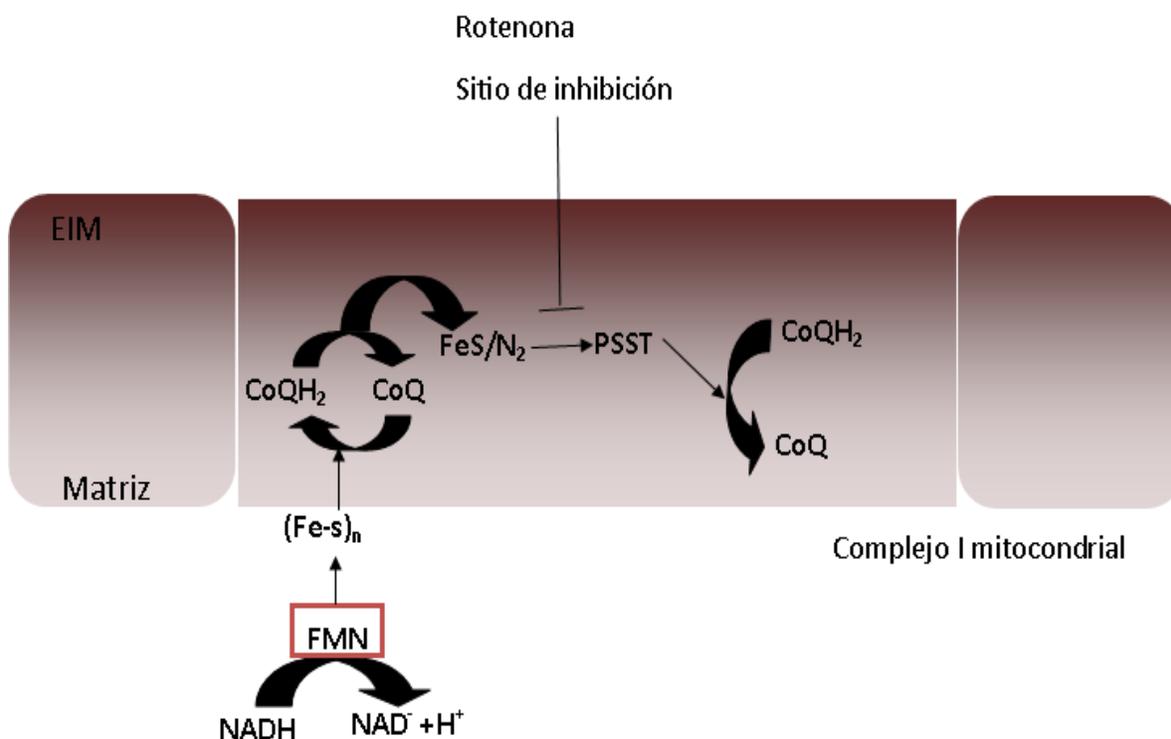


**Figura 4. Mecanismo de toxicidad de la rotenona.** La rotenona es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica y la membrana plasmática de las neuronas dopaminérgicas. La rotenona bloquea el complejo I mitocondrial provocando un incremento en las especies reactivas de oxígeno, incrementando los niveles de estrés oxidativo y desencadenando procesos proapoptóticos o la oligomerización de la  $\alpha$ -sinucleína. Tomado y modificado de (Maries *et al.*, 2003; Bisbal & Sanchez, 2019).

Existe evidencia reciente, que sugiere que los agregados de  $\alpha$ -syn, también llamados oligómeros, tienen un papel importante en la neurodegeneración de la EP, ya que dañan diversas funciones subcelulares (Emmanouilidou *et al.*, 2010; Winner *et al.*, 2011; Colla *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2018).

#### 1.4 La rotenona

La rotenona se utiliza como insecticida, acaricida y pesticida (Satta *et al.*, 2008). La OMS clasifica a este xenobiótico como un pesticida de clase II (moderadamente peligroso), en mamíferos bloquea la oxidación de NADH a NAD provocando la inhibición no competitiva del complejo I mitocondrial de la cadena respiratoria impidiendo así la formación de ATP e induciendo estrés oxidativo (Ji *et al.*, 2015; Heinz *et al.*, 2017) (Figura 5).



**Figura 5. Inhibición del complejo I mitocondrial.** Se muestra el sitio de unión e inhibición de la rotenona al complejo I mitocondrial (Tomado y modificado de (Lümmen, 1998).

En 1985 se utilizó por primera vez en la investigación de la EP la rotenona (Heikkila *et al.*, 1985) un insecticida y pesticida natural que se extrae de las raíces de las plantas de los géneros *Lonchocarpus* y *Derris* (Soloway, 1976). La rotenona es una molécula altamente lipofílica, lo cual le permite cruzar las membranas biológicas entrando a las células sin la necesidad de un transportador específico.

La rotenona, al ser un potente inhibidor de la cadena transportadora de electrones, ha sido empleada para generar un modelo animal de la EP (Betarbet *et al.*, 2000).

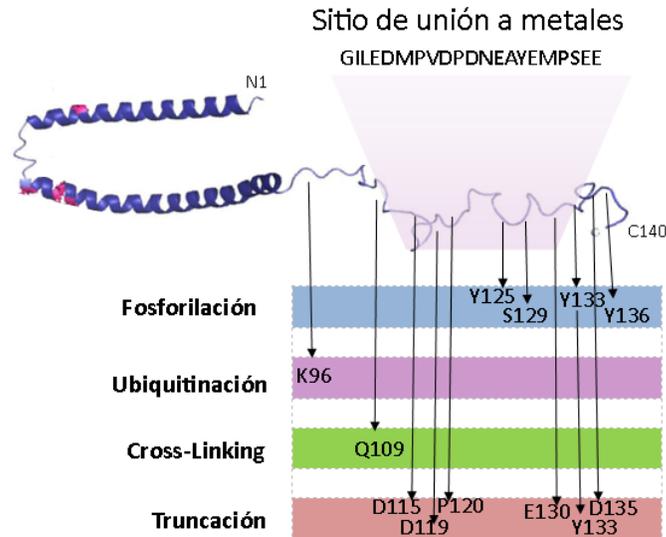
Se sabe que las áreas más vulnerables a la toxicidad por rotenona son: el estriado, la sustancia nigra pars compacta, el hipocampo y la corteza. Estas regiones son importantes en la patogénesis de la EP (Thiffault *et al.*, 2000; Mitra *et al.*, 2015). Se pensaría que al no necesitar un transportador específico, la rotenona no tendría especificidad a algún tipo de células. Sin embargo, estudios han demostrado que las neuronas dopaminérgicas son más susceptibles a la toxicidad por rotenona. Una hipótesis es que la dopamina juega un papel importante en esta especificidad al generar especies reactivas de dopamina (Ahmadi *et al.*, 2008). Estudios *in vitro* han reportado una regulación positiva de DAT producida por rotenona (Sai *et al.*, 2008). Otra de las propuestas es que la rotenona afecta el movimiento vesicular dentro de las neuronas dopaminérgicas aumentando la concentración de estas dentro del espacio intra celular incrementando la toxicidad mediante la alteración del citoesqueleto (Ren *et al.*, 2005). A su vez el bloqueo mitocondrial tiene un efecto más agresivo en las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal debido a la demanda energética que presentan (Bolam & Pissadaki, 2012). Otra de las consecuencias del bloqueo mitocondrial y la disminución en la síntesis de ATP se produce en la internalización de la dopamina a las vesículas, este proceso se lleva a cabo mediante el transportador vesicular de monoaminas de tipo 2 (VMAT2) y es dependiente de ATP (German *et al.*, 2015). Por otra parte se ha reportado una redistribución de VMAT2 producida por rotenona (Watabe & Nakaki, 2008).

Después de la administración sistémica de rotenona, esta puede causar una degeneración crónica y progresiva de la vía nigroestriatal, y procesos similares a los reportados en la patología como: la formación de inclusiones de tipo citoplasmáticas que contienen ubiquitina y  $\alpha$ -syn; alteraciones en la señalización del calcio; inducción de estrés oxidante (producción de especies reactivas de oxígeno [ROS]), disminución de enzimas antioxidantes (ej. superóxido dismutasa [SOD], catalasa y glutatión peroxidasa [GPX]); inflamación; apoptosis; disminución de la tirosina

hidroxilasa (TH); disfunción proteosomal y acumulación de hierro en la SNpc (Betarbet *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017). Actualmente se propone una relación entre el incremento de niveles de DA y las modificaciones de la  $\alpha$ -syn, como una relación en la producción de afectaciones en el SNC, como la neurodegeneración (Subhojit, 2017).

#### 1.4 Modificaciones postraduccionales de la proteína $\alpha$ -syn

La proteína  $\alpha$ -syn sufre múltiples modificaciones postraduccionales como lo son Ubiquitinación, Truncación o fosforilación (Figura 6). En los últimos años la fosforilación en el residuo de Serina 129 ( $pS129$ ) ha ganado interés por parte de los investigadores debido a que en condiciones normales, el cerebro humano posee menos del 4% de  $\alpha$ -syn con esta modificación, sin embargo tanto en la EP como en otras sinucleopatías, este porcentaje se eleva a más del 90% (Fujiwara *et al.*, 2002; Muntané *et al.*, 2012). Aún existe la controversia sobre el papel de las modificaciones postraduccionales de la  $\alpha$ -syn, y sobre los efectos que tiene el incremento en la fosforilación de la  $\alpha$ -syn en la toxicidad o si la toxicidad en las neuronas provoca la fosforilación de la proteína. A pesar de ello, los diferentes estudios han propuesto a la proteína  $\alpha$ -syn ( $pS129$ ) como un buen marcador para modelos de estudio de EP debido a que en ese estado de fosforilación es como se encuentra en los cuerpos de Lewy (Oueslati, 2016).



**Figura 6. Modificaciones postraduccionales de la  $\alpha$ -syn.** Se muestran todas las modificaciones postraduccionales de la proteína  $\alpha$ -syn desde K96 hasta Y136, las cuales se encuentran dentro del sitio de unión a metales y a membrana (Tomado y modificado de (Oueslati, 2016))

Diversos grupos de investigación han estudiado el modelo de rotenona, pero en todos los modelos de EP existe mucha variabilidad debido a que cada uno considera parcialmente el estudio de algunos aspectos a investigar. Las diferencias en la literatura varían de acuerdo con algunos factores que son críticos en la toxicidad que se genera y entre estos están: la vía de administración, así como el tiempo de exposición al neurotóxico o la especie en que se estudia. Algunos estudios como el de (Murakami *et al.*, 2015), proponen al modelo de ratón expuesto crónicamente a rotenona como un modelo de EP a nivel del sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP). Sin embargo, el estudio de la toxicidad de la rotenona puede dar muchos aspectos a investigar; entre ellos pueden evaluarse la agregación de la  $\alpha$ -syn, la disfunción del sistema dopaminérgico; niveles de TH, del transportador de dopamina (DAT) o su transportador vesicular (VMAT-2), la reducción de dopamina o la afectación en la neurotransmisión y la neurodegeneración de la vía nigroestriatal y otros núcleos afectados por la muerte neuronal.

## II. JUSTIFICACIÓN

La rotenona es un bloqueador de clase A del complejo I mitocondrial, capaz de producir degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra (SN) y alterar el estado de fosforilación de la  $\alpha$ -Syn; diversos autores han relacionado este daño con el déficit de la conducta motora (Alam *et al.*, 2004; Venkatesh Gobi *et al.*, 2018). Las evidencias experimentales sobre el tratamiento con rotenona indican que los reguladores de la homeostasis de la dopamina se encuentran alterados (Richardson *et al.*, 2019). Estudios en ratón macho C57BL muestran una administración ip de 2.5mg/kg por 6 días no causó pérdida de la inmunorreactividad de TH en estriado y SNpc (Bhurtel *et al.*, 2019). Existen pocos resultados reportados de un modelo de ratón hembra con administración intraperitoneal (Xiong *et al.*, 2012). Sin embargo, diversos reportes del modelo experimental de rotenona muestran gran variabilidad en la toxicidad que la rotenona genera en los roedores (Schmidt & Alam, 2006; Corona *et al.*, 2010).

Debido a lo expuesto, se ha indagado en los factores que pueden afectar la toxicidad de la rotenona en roedores, y se ha propuesto que son la vía de administración, la dosis y el tiempo del tratamiento, los factores cruciales para reproducir el modelo (Cannon *et al.*, 2009; Xiong *et al.*, 2012). A pesar de los datos ya descritos hasta el momento es indispensable aclarar los mecanismos de toxicidad de la rotenona en el ratón, y evaluar si el tratamiento intraperitoneal de rotenona induce modificaciones sobre la regulación de la síntesis y transporte de dopamina, eventos que afecten sustancialmente la homeostasis dopaminérgica llevando a la muerte celular. Incluso es posible pensar que otros procesos se detonen posteriores a la exposición con rotenona y que se pueda alterar el estado de fosforilación de la  $\alpha$ -Syn, un evento que es de alto interés fisiopatológico debido a que la fosforilación en S129 se presenta aumentada de un 4 a un 90% en las sinucleopatías (Fujiwara *et al.*, 2002).

### **III. HIPÓTESIS**

La administración intraperitoneal de rotenona causa un modelo de toxicidad dopaminérgica en ratones hembra de la cepa CD1.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL**

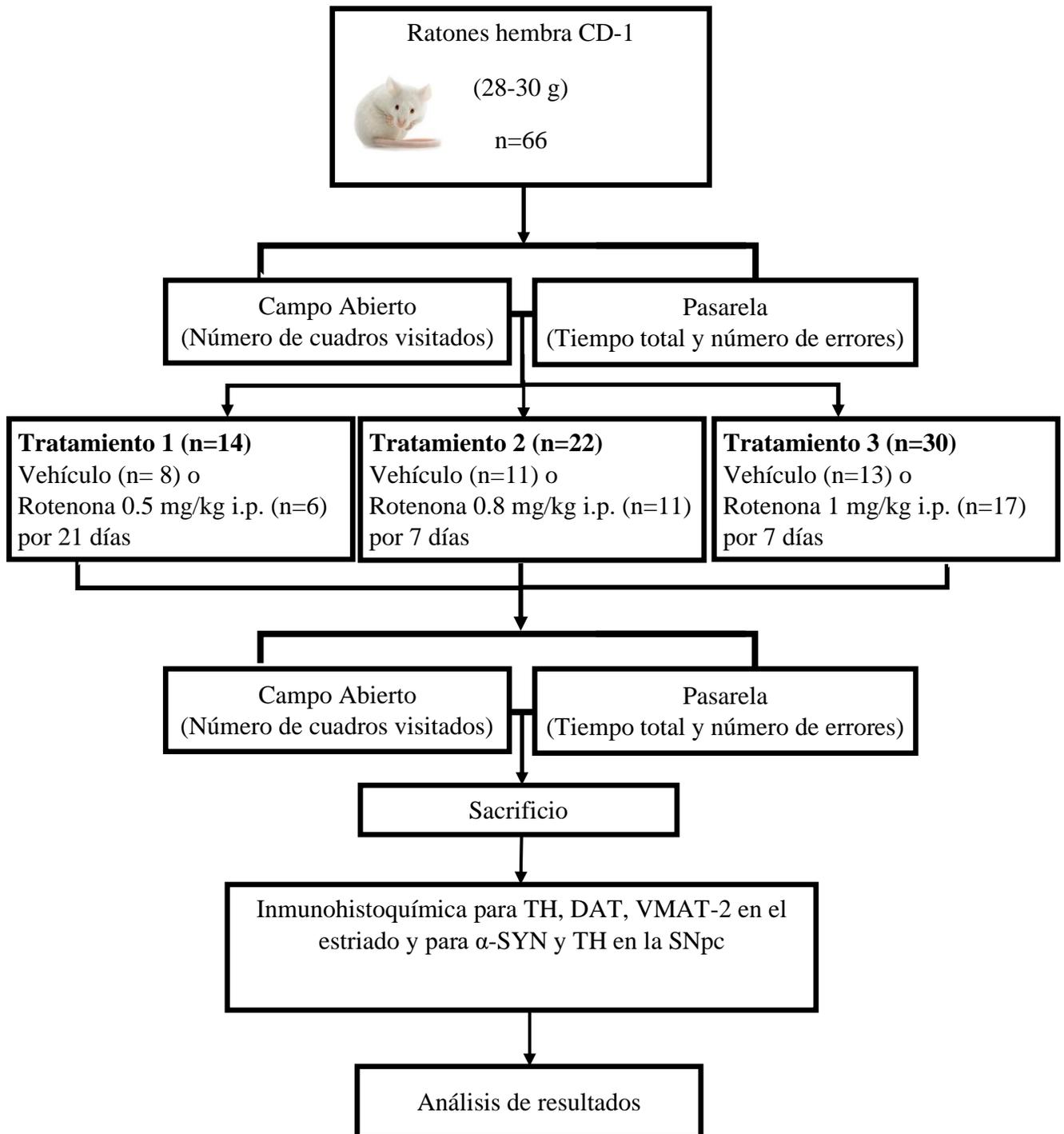
Evaluar los efectos del modelo de toxicidad por la rotenona en las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal de ratones hembra, y sus consecuencias sobre la conducta motora.

#### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Evaluar los efectos de la administración intraperitoneal de rotenona sobre la conducta motora.
2. Determinar los efectos de la administración de rotenona sobre la expresión de la TH, el DAT y el VMAT2 en el estriado.
3. Determinar la expresión de la TH y la  $\alpha$ -Syn en la SNpc posterior al tratamiento intraperitoneal de rotenona.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Diagrama de trabajo



## **5.2 Sujetos experimentales**

Para el desarrollo del presente proyecto se utilizaron 66 ratones hembra de la cepa CD-1 adultos (25-30 g), proporcionados por el Bioterio *Claude Bernard* de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los ratones fueron alojados durante el periodo experimental en el vivario del laboratorio de Neuroquímica, en condiciones de luz-oscuridad de 12/12h, a una temperatura de  $22 \pm 2$  °C y una humedad relativa de  $50 \pm 5\%$ , con alimento y agua *ad libitum*. Los ratones se habituaron por dos semanas antes de comenzar con la administración de rotenona o su vehículo en el vivario. El manejo de los animales se dio bajo las normas establecidas por el comité de ética y la Norma oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. El manejo de los RPBI del proyecto se realizó conforme a la norma NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

Para la formación de los grupos experimentales, los animales fueron aleatorizados con el fin de obtener 6 grupos (3 vehículo y 3 rotenona a las dosis de 0.5, 0.8 y 1 mg/kg), a los cuales se les dio un seguimiento diario de peso corporal y temperatura rectal.

## **5.3 Preparación de la rotenona**

La rotenona (Abcam) se preparó a una concentración de 0.6 mg/mL en una solución de 1:1 Dimetilsulfóxido-Polietilenglicol (DMSO:PEG) y fue almacenada en alícuotas de 2 mL a -20 °C.

## **5.4 Administración de la rotenona**

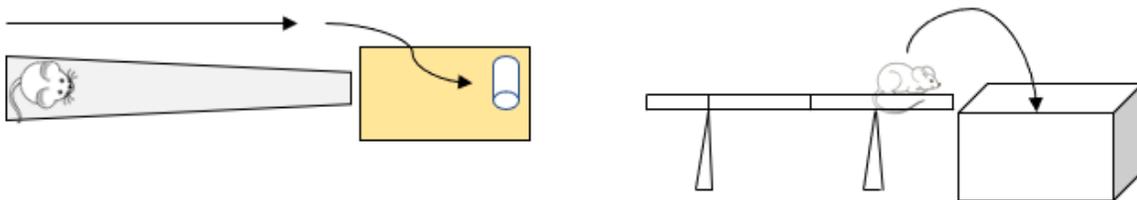
La administración del vehículo (DMSO.PEG) o Rotenona a diferentes dosis (0.5, 0.8 y 1 mg/kg i.p.) se realizó diariamente a los animales entre las 8:00 y 9:00 a.m por 7 y 21 días dependiendo del tratamiento.

## 5.5 Modelo de campo abierto

Para la realización de la prueba de campo abierto, se utilizó una caja de acrílico negro de dimensiones de 55 cm de largo x 60 cm de ancho x 30 cm de alto. El área de exploración fue dividida en cuadros de 10 cm. Al inicio del ensayo, el ratón se colocó en el área central y se le permitió la exploración en el campo abierto por 6 minutos. Al finalizar el tiempo, la caja se limpió con mezcla alcohol y agua para eliminar olores que pudieran perturbar la actividad del siguiente ratón. El parámetro evaluado fue el número de cuadros visitados en 5 minutos por ratón, en cada ensayo se eliminaron los primeros y últimos 30 segundos. La conducta fue videograbada para su posterior análisis (Seibenhener & Wooten, 2015).

## 5.6 Modelo de la Pasarela

La evaluación de la conducta motora se llevó a cabo mediante el modelo de la pasarela (Fleming *et al.*, 2006). Para ello se utilizó una pasarela de plexiglás de 1 m de largo, 17 cm de altura, 3.5 cm en el lado más ancho y 0.5 cm en el lado más estrecho (figura 7) 1 cm por encima de la pasarela se coloca una rejilla con las mismas dimensiones.



**Figura 7. Evaluación de la motricidad por la prueba de la pasarela en ratones.** (A) Vista superior de la pasarela de plexiglás. (B) Vista lateral de la pasarela de plexiglás (modificado de Fleming *et al.*, 2006).

En cada ensayo, el ratón se colocó en el extremo de la parte más ancha de la pasarela y se indujo al animal a recorrerla hasta llegar al otro extremo que posee la parte más estrecha. Un día antes de comenzar con la administración de la rotenona o su vehículo, se realizaron 2 ensayos asistidos en donde se ayudó al roedor a completar la pasarela y 3 no asistidos donde se dejó que el roedor completara el recorrido. Para la evaluación posterior al tratamiento se realizaron únicamente 3 ensayos no asistidos. Los parámetros evaluados fueron: el tiempo que tarda en recorrer la pasarela completa, y el número de errores cometidos (cada paso que da el ratón y falla al apoyar la pata en la rejilla). Todos los ensayos fueron videograbados para su posterior análisis.

### **5.7 Obtención de tejido nervioso para inmunohistoquímica**

Al día siguiente de la evaluación conductual los animales fueron anestesiados con pentobarbital (50 mg/kg i.p.) para posteriormente realizar una perfusión intracardiaca de solución salina isotónica (SSI) y luego paraformaldehído al 4% en PBS 1x (pH=7.4). Al finalizar la perfusión se extrajeron los cerebros los cuales fueron conservados en solución de paraformaldehído al 4% por 1 semana y posteriormente fueron almacenados en PBS hasta la fecha de procesamiento.

Para la obtención de secciones del estriado y la SNpc se realizaron cortes coronales del tejido cerebral a 60  $\mu$ m de espesor utilizando un micrótomo (Leica modelo SM2010 R) con la técnica de congelación con anhídrido carbónico sólido o hielo seco.

### **5.8 Inmunohistoquímica**

Previo a la inmunohistoquímica fueron seleccionados los cortes del tejido nervioso aproximadamente a la altura AP: +0.74 mm respecto de Bregma para el estriado y a AP: -3.16 mm respecto de Bregma para cortes que contenían a la SNpc. Los tejidos se colocaron en una placa para cultivos celulares. Para la

inmunohistoquímica se empleó el método de peroxidasa (HRP) con diaminobencidina (DAB), reportado por Patricio *et al.*, (2019). El buffer empleado durante la prueba fue de PBS con y sin Triton al 0.2% y el bloqueo se realizó con NGS al 5%. El tejido se incubó por dos noches con el anticuerpo primario (Tabla 1), posteriormente con el anticuerpo secundario anti Goat 1:500 marca Vector. Finalmente, los tejidos se expusieron con DAB para inducir la reacción y en el caso de la inmunohistoquímica para VMAT-2 se expusieron con DAB/Ni. Todo el proceso se realizó en agitación constante y a temperatura ambiente.

**Tabla 1. Anticuerpos primarios.**

Anticuerpo primario	Marca	Hospedero	Clase	Concentración
anti-TH	Merk	Mouse	Monoclonal	1:1000
anti-DAT	Merk	Rat	Monoclonal	1:500
anti-VMAT-2	Thermo Fisher	Rabbit	Polyclonal	1:100
anti- $\alpha$ -Syn	Cell Signalling	Rabbit	Monoclonal	1:1000

### 5.10 Análisis de imagen.

Las imágenes obtenidas de las pruebas inmunohistoquímicas se analizaron con el programa ImageJ del NIH.

Se analizaron 2 imágenes por cada hemisferio de cada sujeto experimental. Para el análisis de inmunoreactividad de TH en estriado, DAT y VMAT-2 se realizó un análisis de densitometría semicuantitativa. Las imágenes de TH para SN y  $\alpha$ -Syn se realizó un análisis cuantitativo de cada imagen.

### 5.11 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en la conducta motora para el modelo de campo abierto y en el modelo de la pasarela se presentan como el promedio  $\pm$  E.S.M. Para su estudio los datos se graficaron y analizaron con una prueba ANOVA de una vía, con una prueba post-ANOVA de Tukey, y se consideró como diferencia significativa cuando la  $P < 0.05$ .

Los datos obtenidos del control de peso y la temperatura rectal se presentaron como el promedio  $\pm$  E.S.M y fueron analizados con una prueba *t*-test y se estableció como significativa una  $P < 0.05$ .

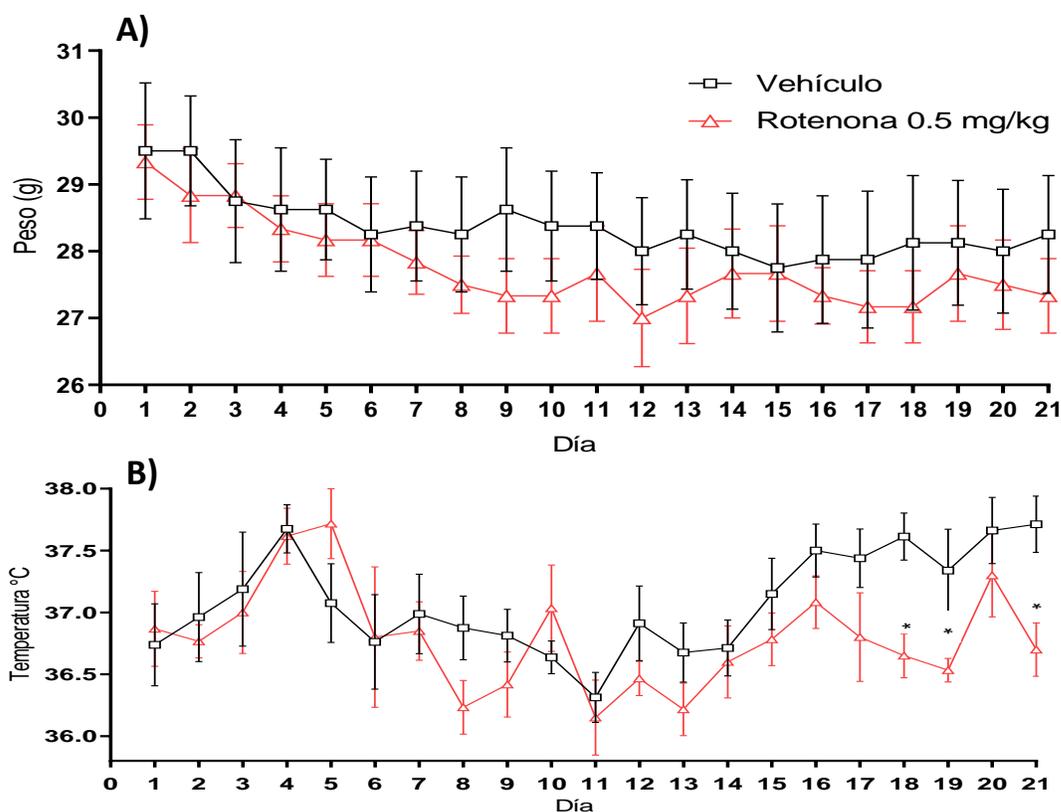
Los resultados obtenidos del análisis de imagen de tipo cuantitativo se realizaron con una prueba ANOVA de una vía y se aplicó un análisis post-ANOVA de Tukey, para la comparación se estableció como diferencia significativa una  $P < 0.05$ .

## VI. Resultados

### 6.1 Efecto fisiológico producido por administración crónica de rotenona.

Como parte del control que se llevó con los animales, se realizó el seguimiento de dos parámetros: La ganancia de peso y la temperatura corporal de los sujetos experimentales, los cuales fueron evaluados durante el tratamiento. El grupo tratado con 0.5 mg/kg de rotenona no mostró cambios en la ganancia de peso durante los 21 días de tratamiento en comparación al grupo vehículo (Figura 8A).

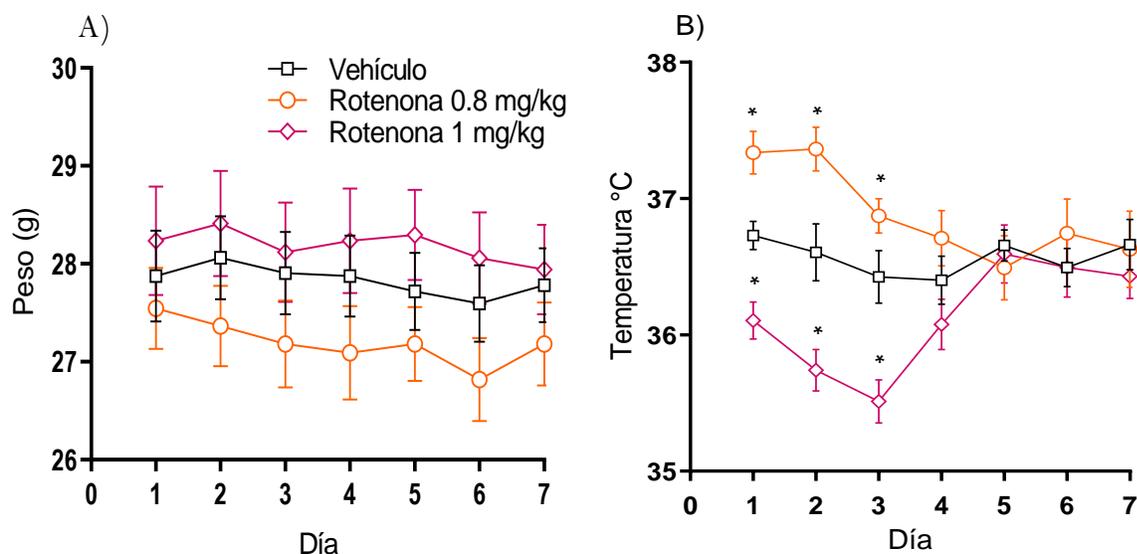
Los resultados del seguimiento de la temperatura corporal mostraron que la administración de rotenona genera una disminución de la temperatura de los sujetos experimentales tratados con 0.5mg/kg de rotenona a partir del día 17, exceptuando el día 20 donde la diferencia no es estadísticamente significativa (Figura 8B).



**Figura 8: Evaluación del peso y la temperatura ratones hembra (0.5 mg/kg).** En la gráfica A) se muestra el seguimiento de la ganancia de peso de los sujetos experimentales tratados con vehículo o rotenona. La gráfica B) muestra la temperatura rectal de los sujetos experimentales durante el tratamiento con Rotenona (Rojo) (n=6) o su vehículo (Negro) (n=8). La administración de rotenona se realizó por 21 días. Los datos se analizaron con una prueba t student con una  $p < 0.05$ .

Los grupos tratados con una dosis mayor de rotenona (0.8 y 1 mg/kg) por 7 días tampoco presentaron cambios estadísticamente significativos en la ganancia de peso corporal (Figura 9A). Sin embargo, la administración de rotenona a la dosis de 0.8 mg/kg causó un incremento de la temperatura en los primeros tres días de administración en comparación con el grupo vehículo. Este incremento es estadísticamente significativo sin embargo a pesar del incremento de temperatura no se genera hipertermia ya que la temperatura normal del ratón es de 36.5 a 38°C.

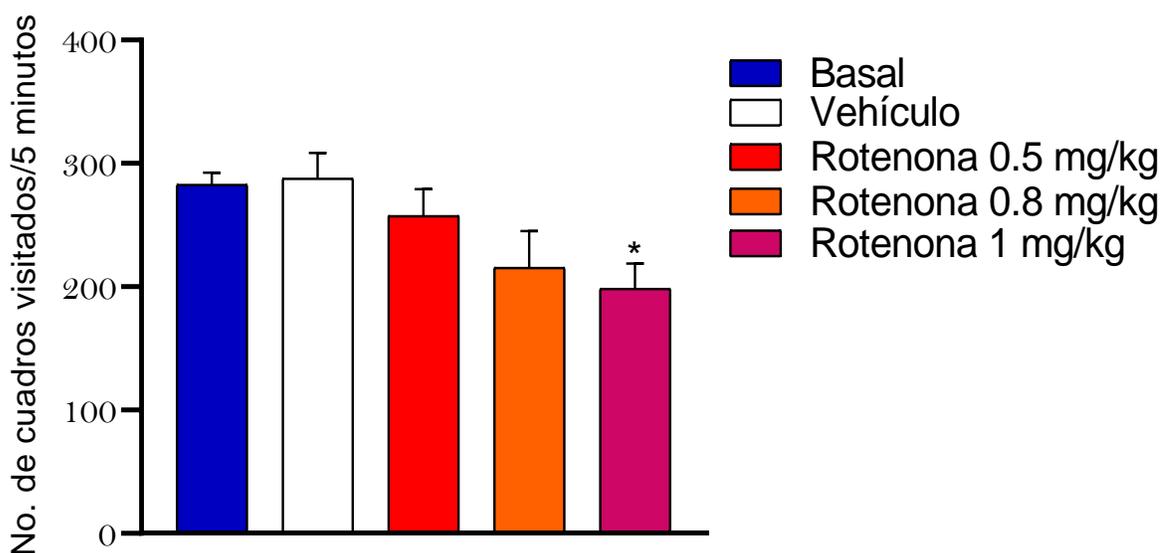
Por el contrario, la administración de rotenona a una dosis de 1 mg/Kg indujo una disminución de la temperatura corporal en los primeros tres días de tratamiento en comparación con el grupo vehículo. La temperatura presentada por el grupo tratado con 1 mg/Kg de rotenona el segundo día fue de 35.7 °C y el tercer día de 35.5 °C generando hipotermia en los ratones (Figura 9B). A partir del día 4 de tratamiento, la temperatura fue similar para todos los grupos experimentales y se mantuvo así hasta finalizar el tratamiento.



**Figura 9: Evaluación del peso y la temperatura ratones hembra (0.8 y 1 mg/kg).** En la gráfica A) se muestra el seguimiento de la ganancia de peso de los sujetos experimentales tratados con vehículo (Negro) (n=24), Rotenona 0.8 mg/kg (Naranja) (n=11), y Rotenona 1 mg/kg (Rosa) (n=17) durante 7 días. La gráfica B) muestra la temperatura rectal de los sujetos de experimentación durante el tratamiento. Los datos se analizaron con una prueba *t* student con una \**p*<0.05.

## 6.2 Efecto de la administración de rotenona sobre la conducta motora

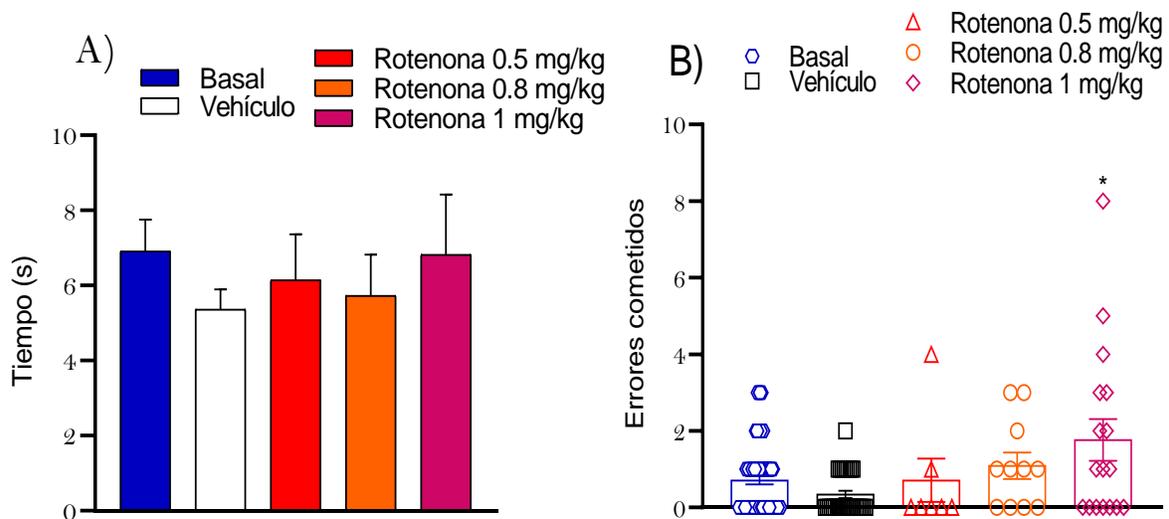
La exploración en el campo abierto permitió evaluar la actividad motora de los animales previo al tratamiento (basal) y posterior al tratamiento con vehículo o rotenona. Durante la prueba se observó que los sujetos experimentales previos al tratamiento recorrían en promedio  $282 \pm 1$  cuadros en los 5 minutos, un número similar al presentado por el grupo que recibió el vehículo  $287 \pm 1$  (Figura 10). Posterior al tratamiento con rotenona a 0.5 mg/kg los animales presentaron una disminución del 9% en la exploración mientras que el grupo administrado con 0.8 mg/kg de rotenona presentó una mayor disminución (23% en la exploración) respecto a su grupo vehículo y el grupo basal. En cuanto al grupo con rotenona 1 mg/kg presentó una disminución en la exploración del 30% durante la prueba en comparación con el grupo vehículo y el basal.



**Figura 10: Evaluación de la conducta motora por prueba de campo abierto.**

Los datos muestran el promedio de cuadros visitados en la exploración del campo abierto pre-tratamiento o basal (n=66), vehículo (n= 32), rotenona 0.5 mg/kg por 21 días (n=6), rotenona 0.8mg/kg por 7 días (n=11) y rotenona 1 mg/kg por 7 días (n=17). El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una prueba post-ANOVA de Tukey \*P<0.05.

Con la finalidad de evaluar la coordinación de los animales se realizó la prueba de la pasarela. El primer parámetro evaluado es el tiempo que se requiere para que los sujetos recorran la pasarela (Figura 11 A). Los sujetos administrados ya sea con rotenona (0.5, 0.8 y 1 mg/kg) o su vehículo, no presentan diferencia estadísticamente significativa en tiempo requerido para completar la prueba en comparación con el grupo basal y con el vehículo, en cada ensayo los animales demoraron en promedio  $7 \pm 0.8$  s. Para evaluar la coordinación motora se cuantificó el número de errores durante el recorrido en la pasarela, un parámetro de la ejecución motora en la prueba (Figura 11 B), se encontró que el promedio de errores cometidos se incrementó para los animales que recibieron las dosis de 0.8 y 1 mg/kg de rotenona, y se observó que la dosis más alta provocó una latencia mayor a cometer errores durante la prueba.

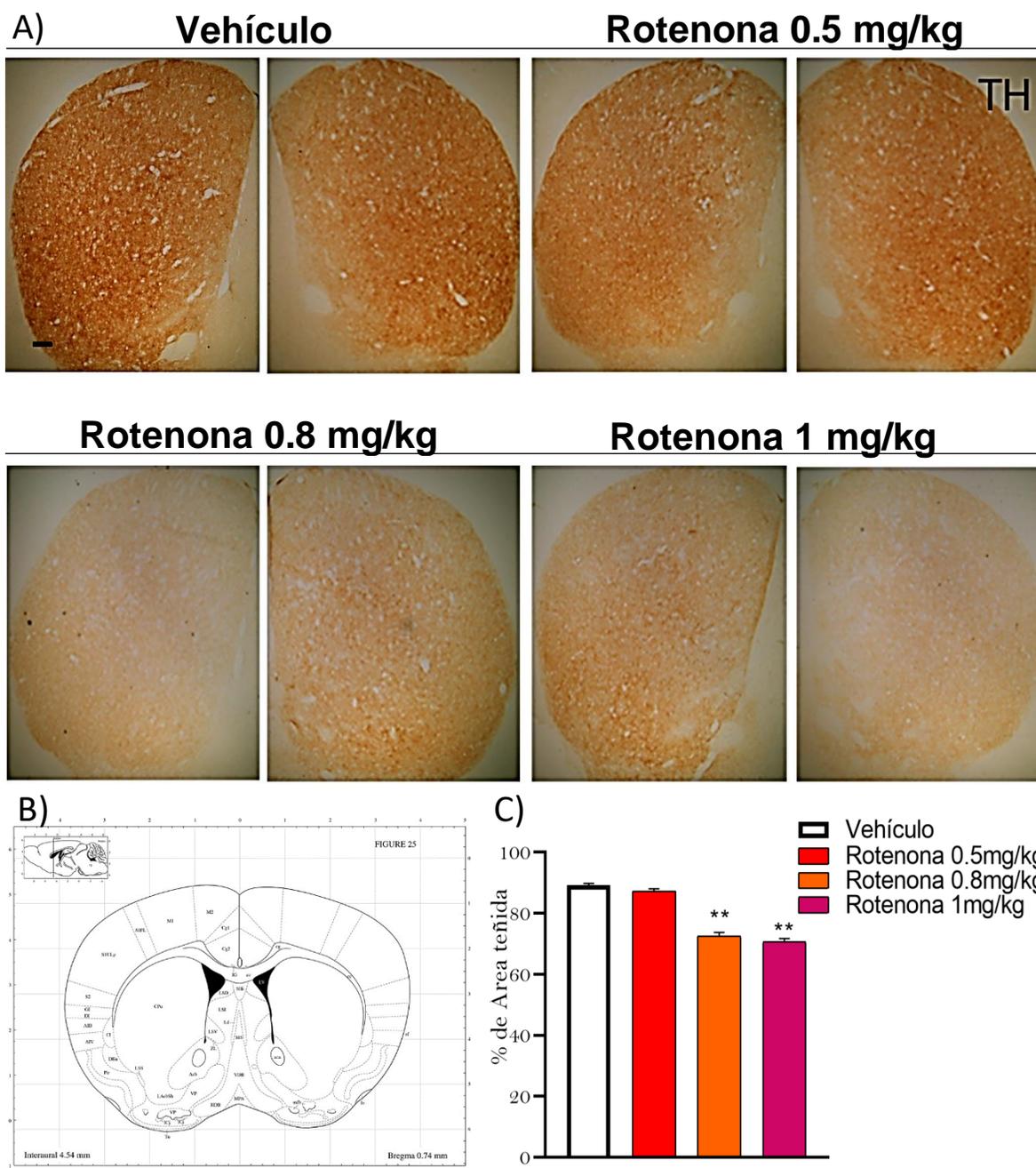


**Figura 11: Efecto de la rotenona sobre coordinación motora en prueba de la pasarela.** En A) se presenta el promedio de tiempo requerido por los sujetos experimentales para completar la prueba. En B) se graficó el número de errores cometidos durante el trayecto en la pasarela tanto grupal como individualmente. La conducta motora se determinó previo al tratamiento (n=66) y posterior al tratamiento con vehículo (n=32) o rotenona. 0.5 mg/kg por 21 días (n=6), rotenona 0.8mg/kg por 7 días (n=11) y rotenona 1 mg/kg por 7 días (n=17). El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una post-ANOVA de Tukey \*P<0.05.

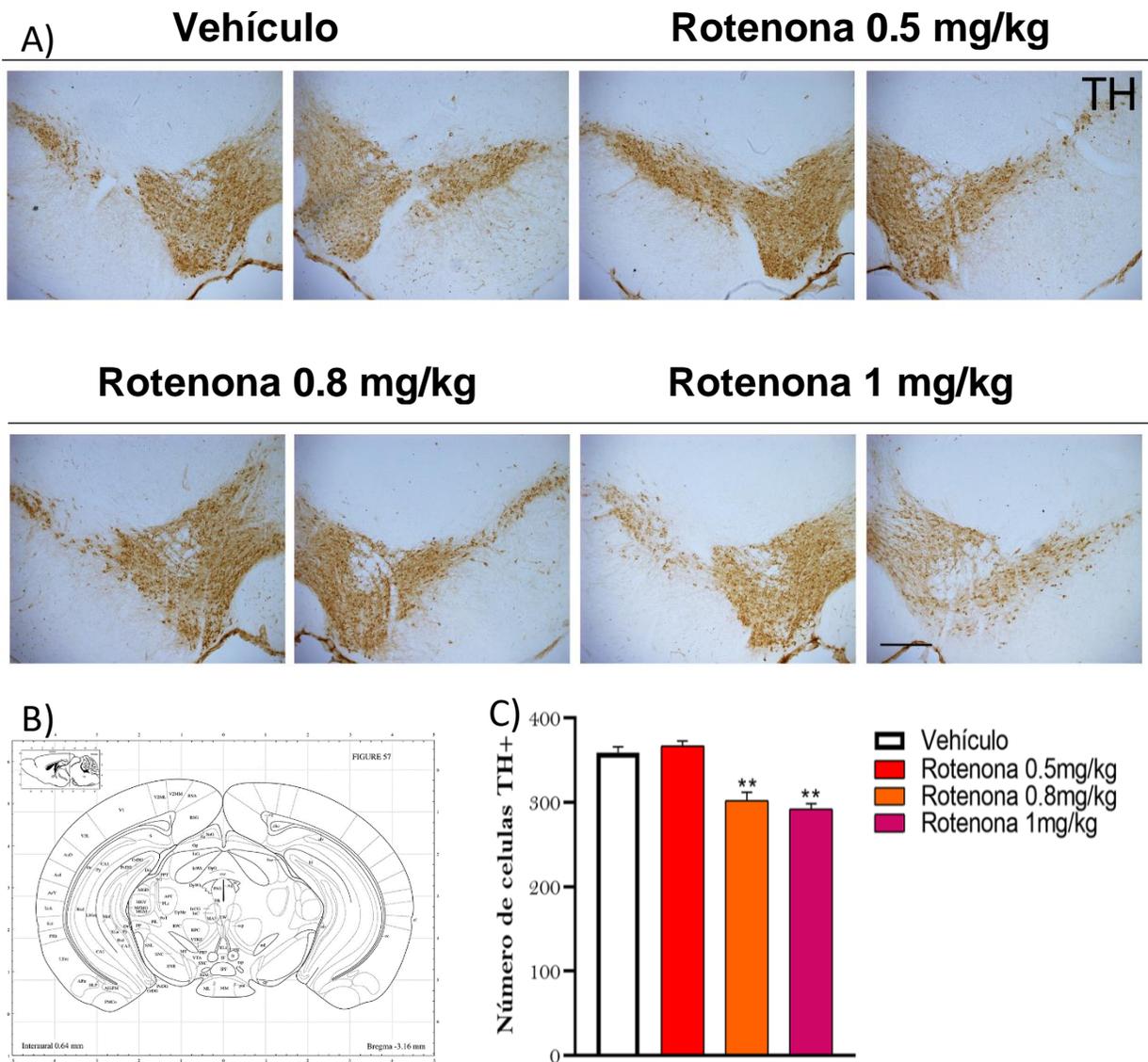
### **6.3 La administración de rotenona disminuye la inmunoreactividad de TH en el estriado y SNpc**

Con la finalidad de determinar si la rotenona causa modificaciones en la vía dopaminérgica nigroestriatal, se evaluó la inmunoreactividad para la proteína TH en el estriado y SNpc. El análisis de imagen permitió identificar el porcentaje de área teñida para la TH en estriado. Los resultados mostraron una disminución del 20 y 21% de la inmunoreactividad de TH para los grupos tratados con 0.8 y 1 mg/kg de rotenona respectivamente, cuando fueron comparados con el grupo vehículo. Por el contrario, en el grupo tratado con 0.5 mg/kg de rotenona no se observaron cambios en la inmunoreactividad a TH en comparación con el grupo vehículo (Figura 12).

El análisis de la SNpc fue mediante el conteo de células TH-IR positivas. El grupo vehículo mostró una media de  $359 \pm 6$  células positivas a TH+. La administración de rotenona 0.5mg/kg en las ratonas no causó modificaciones estadísticamente significativas en comparación con el grupo vehículo (Figura 13). Por otra parte, las dosis más altas de rotenona (0.8 y 1mg/kg) si causaron una disminución del número de células TH+ en un 17% y 19% en los grupos tratados con de rotenona respectivamente, comparadas con el grupo vehículo.



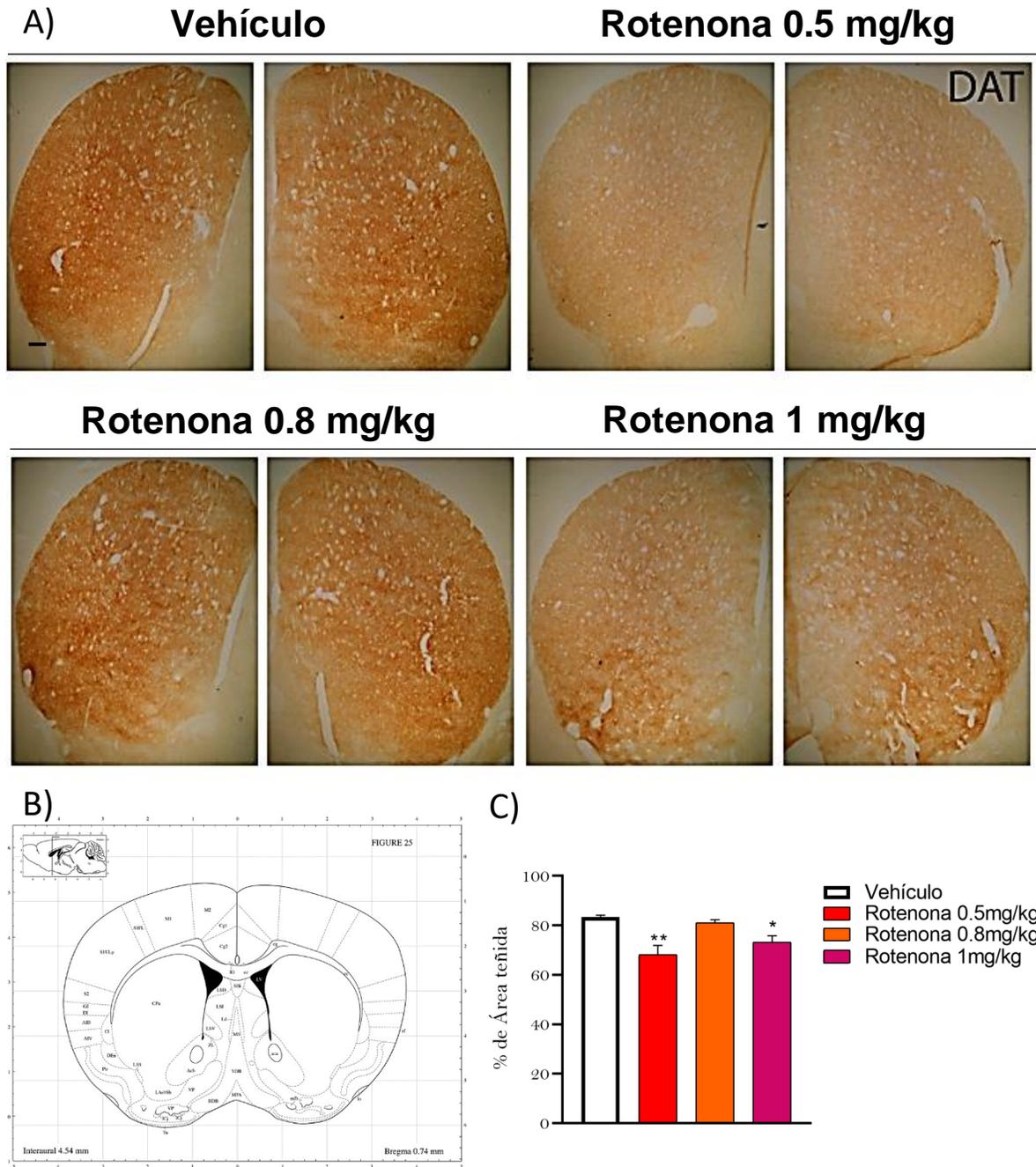
**Figura 12: Efecto de la rotenona en la inmunoreactividad de TH en estriado.** En el panel A) de fotomicrografías se muestra el estriado teñido para cada grupo con rotenona a diferentes dosis. B) muestra el diagrama de Paxinos para ubicar el nivel donde se realizaron los cortes. En la gráfica C) se muestra el promedio del porcentaje de área teñida para TH posterior al tratamiento con rotenona o vehículo. Los grupos experimentales incluyen al vehículo (n=21), rotenona 0.5 mg/kg por 21 días (n=6), rotenona 0.8 mg/kg por 7 días (n=7) y rotenona 1 mg/kg por 7 días (n=10). Barra de escala 200µm. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una prueba post-ANOVA de Tukey \*\*P<0.01.



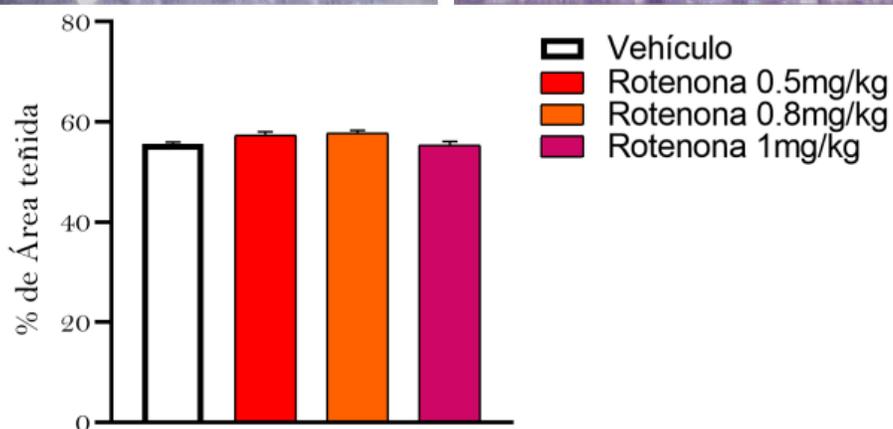
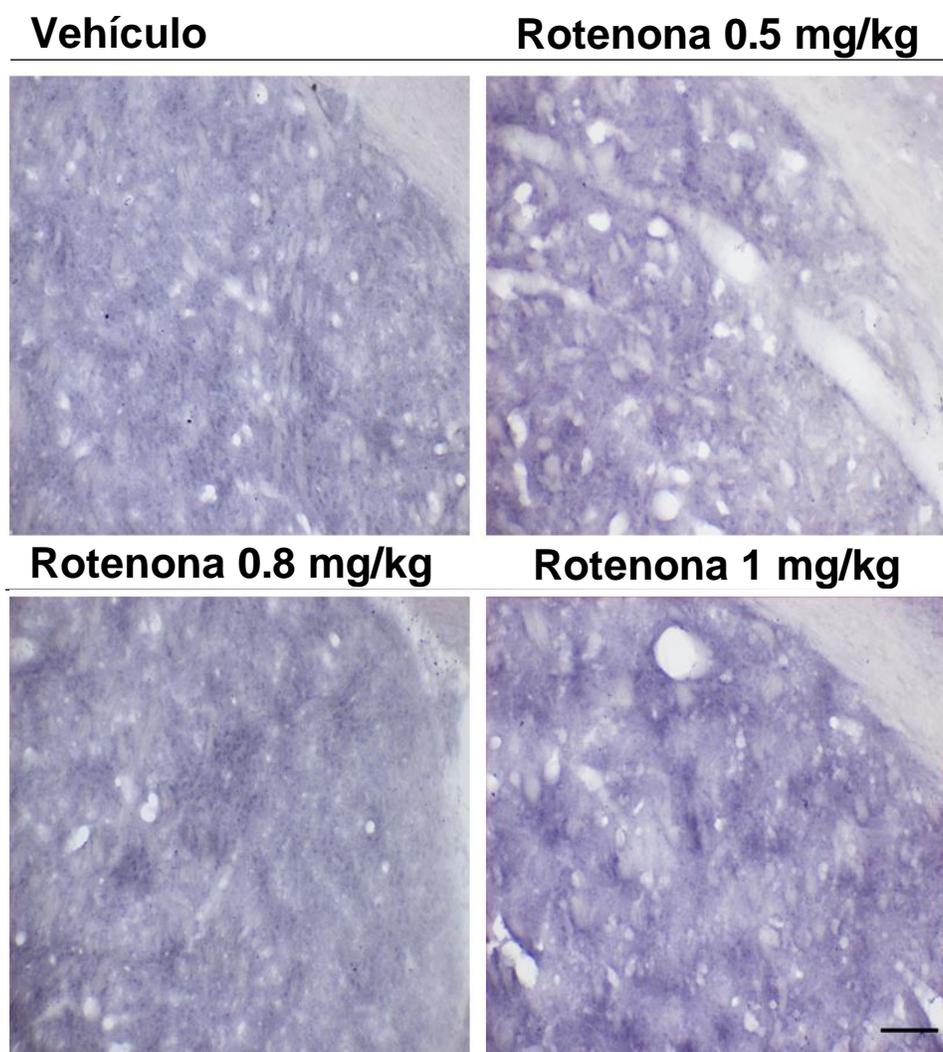
**Figura 13: Efecto de la rotenona sobre la inmunorreactividad a TH en SNpc.** En el panel de fotomicrografías A) se muestra el panel de inmunorreactividad a TH para los grupos vehículo, rotenona a diferentes dosis. B) muestra el diagrama de Paxinos para ubicar el nivel donde se realizaron los cortes. En la gráfica C) se muestra el promedio del número de células positivas a TH en la SNpc para cada grupo, vehículo (n=21), rotenona 0.5 mg/kg por 21 días (n=6), rotenona 0.8 mg/kg por 7 días (n=7) y rotenona 1mg/kg por 7 días (n=10). Barra de calibración 300  $\mu$ m. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una post-Tukey **\*\*P<0.01**.

#### **6.4 Efecto del tratamiento con rotenona sobre la inmunoreactividad del DAT y VMAT-2 en el estriado**

La inmunoreactividad para DAT en el estriado puede indicar cambios en el sistema de recaptura para la DA, lo cual puede afectar la homeostasis del neurotransmisor. Para conocer los efectos de la rotenona sobre la inmunoreactividad a DAT se evaluó el porcentaje de área teñida en los estriados de los diferentes grupos experimentales. Los resultados sobre la inmunoreactividad de DAT en el grupo con tratamiento de rotenona 0.5 mg/kg por 21 días mostró una disminución del 19% respecto al grupo vehículo (Figura 14). Los animales con la administración de rotenona 0.8 mg/kg por 7 días no muestran cambios significativos sobre la inmunoreactividad de DAT en el núcleo estriado, comparados con el grupo control. Finalmente, en el grupo tratado con rotenona a 1 mg/kg por 7 días se encontró una disminución del 13% en el estriado en comparación con el grupo vehículo. Posterior a la evaluación del transportador de dopamina, evaluamos la inmunoreactividad a VMAT-2. La cuantificación para la marca del transportador vesicular en el estriado en los grupos que recibieron la rotenona a las dosis de 0.5, 0.8 y 1 mg/kg en comparación con el grupo vehículo fue similar en su distribución y en su densidad (Figura 15). El porcentaje de área teñida para el grupo vehículo fue de 55%. Los grupos tratados con rotenona 0.5 y 0.8 mg/kg incrementaron 2% el área teñida, este incremento no es estadísticamente significativo. Finalmente, el grupo tratado con 1 mg/kg se comportó de igual manera al grupo vehículo con 55% de área teñida.



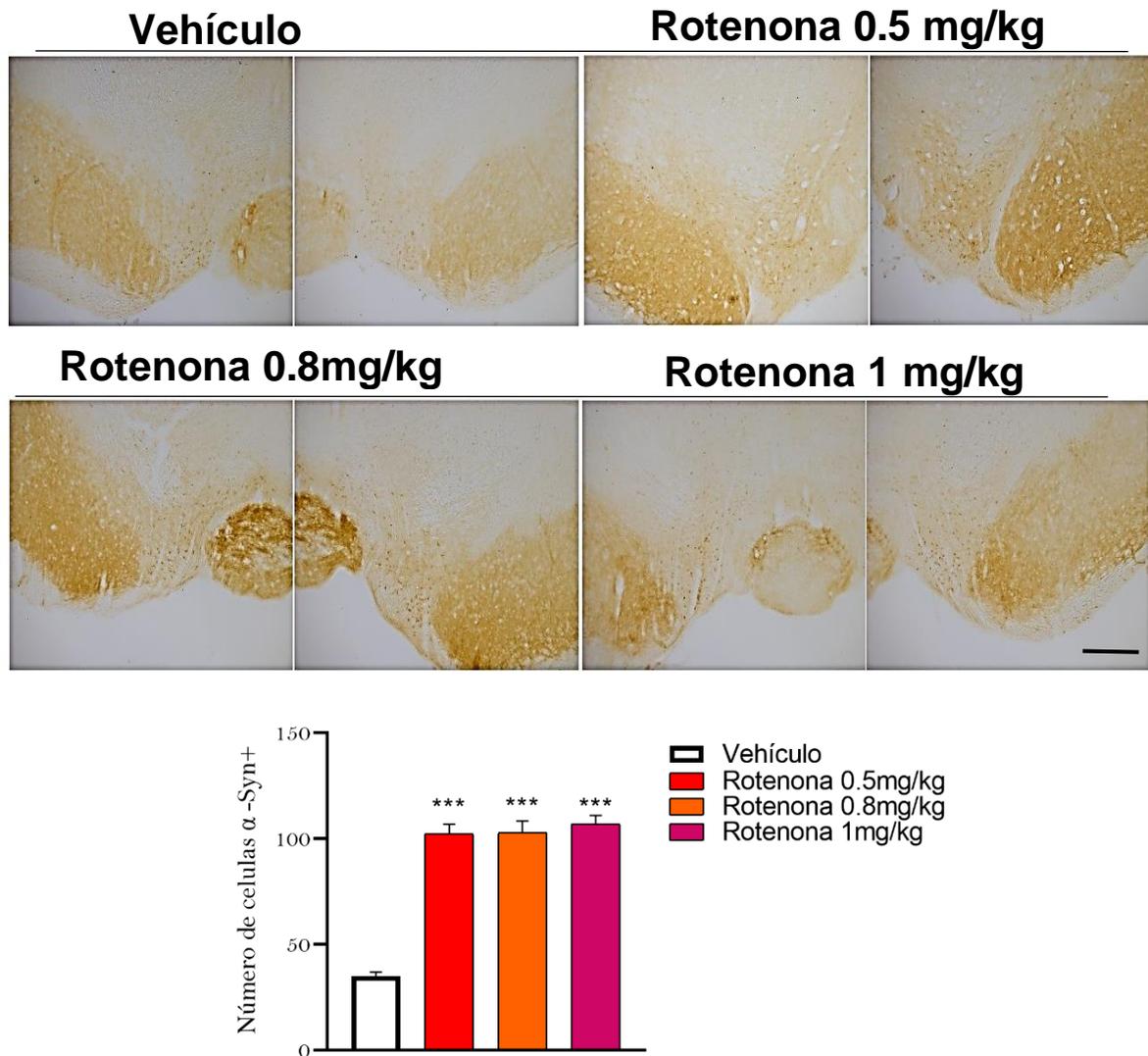
**Figura 14: Efecto de la rotenona sobre la inmunorreactividad a *DAT* en *estriado*.** En el panel de fotomicrografías A) se muestra el panel de inmunorreactividad a *DAT* para los grupos vehículo y rotenona a diferentes dosis. B) muestra el diagrama de Paxinos para ubicar donde se realizaron los cortes. En la gráfica C) se muestra el promedio del porcentaje de área teñida para *DAT* posterior al tratamiento con rotenona o vehículo. Los grupos experimentales incluyen al vehículo (n=21), rotenona 0.5 mg/kg por 21 días (n=6), rotenona 0.8 mg/kg por 7 días (n=7) y rotenona 1 mg/kg por 7 días (n=10). Barra de calibración 200  $\mu$ m. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una prueba post-ANOVA de Tukey \*P<0.05, \*\*P<0.01.



**Figura 15. La inmunorreactividad para VMAT-2 en estriado no se modifica posterior al tratamiento con rotenona.** En el panel de fotomicrografías se muestra el panel de inmunorreactividad a VMAT-2 para Vehículo, rotenona 0.5, 0.8 y 1 mg/kg. En la gráfica se muestra el porcentaje de área teñida para VMAT-2 para los grupos Vehículo (n=21), rotenona 0.5 mg/kg por 21 días (n=6), rotenona 0.8mg/kg por 7 días (n=7) y rotenona 1mg/kg por 7 días (n=10). Barra de calibración 100  $\mu$ m. El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una prueba post-ANOVA de Tukey.

## 6.5 Efecto de la rotenona sobre la inmunoreactividad de la proteína $\alpha$ -Syn fosforilada en S129

Con el fin de estudiar si la rotenona produce un efecto sobre el estado de fosforilación de la proteína  $\alpha$ -Syn se realizó la prueba de inmunohistoquímica para la proteína fosforilada en S129 en la *SNpc*.



**Figura 16. Efecto de la rotenona en la inmunoreactividad de  $\alpha$ -Syn fosforilada en S129.** En el panel de fotomicrografías se muestra el panel de inmunoreactividad a  $\alpha$ -Syn para el vehículo y rotenona 0.5, 0.8, 1 mg/kg. En la gráfica se muestra el resultado de porcentaje de células positivas a  $\alpha$ -Syn. Las barras representan el promedio de células positivas posterior al tratamiento para el vehículo (n=21), rotenona 0.5 mg/kg por 21 días (n=6), rotenona 0.8 mg/kg por 7 días (n=7) y rotenona 1 mg/kg por 7 días (n=10). Barra de escala 300  $\mu$ m El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de una vía y una post-Tukey \*\*\*P<0.001.

El análisis de inmunoreactividad para la proteína  $\alpha$ -Syn fosforilada en Ser129 para el grupo vehículo fue en promedio  $35 \pm 2$  células positivas a  $\alpha$ -Syn. Por su parte los grupos tratados con rotenona presentaron un incremento en el número de células  $\alpha$ -Syn S129 positivas. El grupo tratado con 0.5 mg/kg de rotenona en promedio tuvo  $102 \pm 6$  células positivas al igual que el grupo tratado con 0.8 mg/kg. Por su parte el grupo tratado con 1 mg/kg presentó  $106 \pm 4$  células  $\alpha$ -Syn S129 positivas.

## VII. Discusión

La rotenona, es un potente inhibidor de la cadena transportadora de electrones y se emplea para generar un modelo animal de la EP (Betarbet et al., 2000;(Bhurtel *et al.*, 2019). Si bien, este neurotóxico puede generar modificaciones a nivel celular es importante determinar las dosis por vía intraperitoneal a las que se puede inducir alteraciones en la vía nigroestriatal y sobre la conducta motora de los animales. El presente trabajo tuvo como objetivo establecer un modelo de toxicidad con la administración intraperitoneal de rotenona en ratonas, un neurotóxico que a pesar de que ha sido empleado desde hace más de tres décadas, genera amplia discusión sobre su uso en el ratón porque presenta variabilidad en sus efectos y no se ha evaluado a detalle en los diferentes procesos bioquímicos y conductuales. Por ello para estudiar la toxicidad de la rotenona se emplearon ratonas adultas de la cepa CD-1, y se evaluó la administración de 0.5 mg/kg por 21 días, obteniendo una letalidad media. Con el fin de disminuir la letalidad se disminuyó el tiempo de administración a 0.8 mg/ kg, dosis a la cual no se observó letalidad y si se encontraron cambios tanto conductuales como bioquímicos. Tras evaluar la toxicidad de rotenona a 0.8 mg/kg, se aumentó la dosis a 1 mg/kg en otro grupo de ratonas y se conservó el tiempo de administración. Este último grupo tampoco presentó letalidad y mostró una mayor toxicidad tanto a nivel conductual como bioquímico. Estos resultados nos permitieron conocer los efectos de la toxicidad de la rotenona en las neuronas dopaminérgicas del estriado y la SNpc de ratonas, así como sus consecuencias en la conducta motora.

En todos los tratamientos se realizó un seguimiento del peso corporal y la temperatura durante el tratamiento con el neurotóxico. La administración de rotenona a las distintas dosis utilizadas no modificó la ganancia de peso en comparación con el grupo vehículo. Si bien en otros estudios con roedor se reporta disminución del peso cuando son expuestos a rotenona (Cannon *et al.*, 2009; Inden *et al.*, 2011), es importante remarcar en dichos estudios la vía de administración es oral, lo que podría provocar la alteración directa del metabolismo de los roedores, contrastando la administración sistémica utilizada en el presente proyecto la cual a

las dosis utilizadas no producen alteraciones en el metabolismo de los ratones hembra.

Por otra parte, se observó que la administración de 0.5 mg/ kg de rotenona induce una disminución en la temperatura corporal del ratón a partir del día 17 en comparación con el grupo vehículo, sin embargo, esta disminución no es fisiológicamente relevante ya que, a pesar de la disminución, los ratones se mantienen dentro de los parámetros normales de temperatura del ratón (36.5 - 38°C). A su vez, el incremento de la temperatura corporal de los ratones tratados con de 0.8 mg/kg de rotenona tampoco supera las condiciones normales del ratón por lo cual no se considera hipertermia. Sin embargo, el grupo tratado con 1 mg/kg de rotenona presenta disminución de la temperatura corporal durante los primeros tres días de administración (~36.5°C) llegando a una temperatura inferior a la temperatura corporal considerada normal en los ratones. Este resultado contrasta con el mostrado por Hu y colaboradores (2016) quienes mostraron que una administración de rotenona a 1 mg/kg en ratones C57/BL no produce hipotermia a las 6 y 24 horas posteriores a la administración, esta diferencia puede ser debido a la cepa utilizada, el ratón C57BL/6 es un ratón endogámico por su parte el ratón CD-1 presenta una variabilidad genética entre individuos lo que genera que el efecto sea distinto entre los sujetos experimentales. La hipotermia que se presenta en los primeros días puede ser una respuesta neuroprotectora ante el bloqueo del complejo I mitocondrial reduciendo así el metabolismo energético de las neuronas.

En cuanto a la evaluación de la conducta motora evaluada por la prueba de la pasarela, se observó que la rotenona a 0.5 y 0.8 mg/kg no altera la exploración de los sujetos experimentales. Sin embargo, en el grupo tratado con 1 mg/Kg existe una disminución del 30% en la exploración, lo indica que existe un daño a nivel del SNC. Con el fin de evidenciar daños en el sistema locomotor regulado por los ganglios basales, se utilizó la prueba de la pasarela la cual nos permite evaluar la coordinación de los sujetos experimentales. Los resultados mostraron que la administración de rotenona no altera el tiempo requerido para cruzar la pasarela en ninguna de las dosis utilizadas. Sin embargo, es importante destacar que la

rotenona a 1 mg/kg incrementó el número de errores al cruzar la pasarela, lo que indica una alteración sobre la coordinación motora. Este resultado contrasta con el publicado por Bhurtel y colaboradores (2019) donde una administración intraperitoneal de 2.5 mg/kg por 6 días de rotenona no incrementó los errores durante la prueba de la pasarela (Bhurtel et al., 2019). Esta diferencia podría deberse a que en estos experimentos se empleó el ratón macho C57BL y en el presente estudio se utilizaron hembras CD-1. Hasta aquí los resultados indican que la administración de 1 mg/kg durante 7 días produce alteraciones motoras, lo cual puede sugerir una alteración a nivel del SNC; hasta el momento se ha propuesto que las áreas más vulnerables a la toxicidad por rotenona son: el estriado, la sustancia nigra *pars compacta*, el hipocampo y la corteza. Estas regiones son importantes en la patogénesis de la EP (Thiffault et al., 2000; Mitra et al., 2015).

Teniendo en cuenta la vulnerabilidad de las neuronas DA de la vía nigroestriatal a la pérdida de ATP (Ren et al., 2005; Ahmadi et al., 2008; Bolam & Pissadaki, 2012) y el papel que juegan en el control del movimiento, se evaluaron marcadores de la regulación de DA de la vía nigroestriatal. Se evaluó la inmunoreactividad de la enzima TH, ya que esta es la enzima limitante de la biosíntesis de DA. Nuestros resultados mostraron que el grupo tratado con 0.5 mg/kg durante 21 días no presentó una disminución de la inmunorreactividad para la TH en el estriado. Por su parte, los grupos tratados con 0.8 y 1 mg/kg tuvieron una disminución del 20 y 21% respectivamente. Este resultado podría indicar que la administración de rotenona a 0.5 mg/kg no es suficiente para generar un daño celular o modificaciones en el proceso de biosíntesis de DA, esto podría deberse a que la rotenona se metaboliza rápidamente en compuestos menos activos (Caboni et al., 2004) y el bloqueo que presenta al complejo I mitocondrial no es un bloqueo total, por lo cual para generar un efecto de toxicidad requiere de mayor biodisponibilidad (Ji et al., 2015). Para evaluar si existían modificaciones en el número de neuronas inmunorreactivas a TH de la SNpc, se determinó la inmunorreactividad para TH. El resultado fue similar al encontrado en el estriado. El grupo tratado con 0.5 mg/kg de rotenona no presentó cambios en el número de células positivas a TH, mientras que los grupos de 0.8 y 1 mg/kg presentaron una

disminución de 17 y 19% en el número de células positivas a TH, respectivamente al compararlos con el grupo vehículo, lo cual sugiere una disminución de la señalización de la SNpc al estriado dentro de los ganglios basales aumentando la actividad de la vía indirecta y reduciendo la actividad de la vía directa, evitando la ejecución de movimientos controlados como se puede observar en el aumento de errores durante la prueba de la pasarela.

Se sabe que la rotenona altera el transporte vesicular mediante la modificación del citoesqueleto (Ren *et al.*, 2005). En el presente proyecto, se realizó la determinación de la inmunorreactividad para DAT y VMAT-2 en el estriado con la finalidad de conocer si había cambios en las proteínas de transporte de dopamina, tanto a nivel extracelular como vesicular. Al evaluar la presencia de DAT y VMAT-2 en los animales tratados con rotenona a las diferentes dosis observamos una ligera disminución de DAT, en los grupos con 0.5 y 1 mg/kg de rotenona respecto al vehículo. Sin embargo, el grupo de 0.8 mg/kg de rotenona no presentó diferencias cuando se comparó con el grupo vehículo, lo que indicaría que la regulación de DAT por rotenona es en primer lugar por el tiempo de exposición al neurotóxico que a la dosis utilizada.

La evaluación del transportador VMAT-2 es crucial en ambientes de toxicidad, por ser una proteína clave en el almacenamiento y protección de la dopamina frente a su oxidación. Los resultados no indicaron modificaciones en la inmunorreactividad para VMAT-2 producida por la administración de rotenona. Este resultado sugiere que la expresión de VMAT-2 no se ve alterada por la administración de rotenona, sin embargo, se desconoce la actividad de este, parámetro que resulta importante debido a que es dependiente de una ATPasa y por consiguiente de la generación de energía por parte del complejo I.

Con los hallazgos encontrados, consideramos que las modificaciones bioquímicas por la administración de 0.5, 0.8 no resultan de relevancia para afectar el comportamiento en la conducta motora de las ratonas, ya que los animales realizaron tanto la exploración como la ejecución en la pasarela de forma similar al grupo vehículo. En contraste, en el presente trabajo evidenció una disminución TH-

IR y en la presencia de DAT producida por la administración de rotenona 1 mg/kg i.p. por 7 días, esto acompañado de un déficit motor y una disminución en la coordinación de las ratonas. Es importante investigar si estas modificaciones son permanentes y si una administración a largo plazo genera cambios más pronunciados a nivel de la síntesis y transporte de dopamina, así como sobre las habilidades motoras.

Finalmente, se determinó el estado de fosforilación de la proteína  $\alpha$ -Syn en S129 ya que es la modificación postraduccional que prevalece en las sinucleopatías y es el principal componente de los CL (Fujiwara *et al.*, 2002). Es importante aclarar que se ha descrito que el modelo de rotenona es capaz de recrear los CL, sin embargo, en el presente estudio, analizamos solo el estado de fosforilación de la proteína y no la presencia de dichos cuerpos. La administración de rotenona a las diferentes dosis empleadas triplicó la inmunorreactividad a  $\alpha$ -Syn-pS129 en VTA, en comparación al grupo vehículo; sin cambios en la SNpc. Si bien se esperaba que la SNpc tuviera mayor cantidad de  $\alpha$ -Syn fosforilada en S129, fue VTA la que presentó la mayor inmunorreactividad a  $\alpha$ -Syn-pS129. Este hecho sugiere que la rotenona administrada de forma subaguda genera cambios sobre la fosforilación de la  $\alpha$ -Syn y que estos pueden anteceder a la neurodegeneración de la vía nigroestriatal o a las modificaciones que llevan a una alteración de las conductas motoras. Este resultado podría también fortalecer la hipótesis de un un daño en VTA en la EP. Diversos autores descartan este hecho (Mosharov *et al.*, 2009). Sin embargo, cada vez se presenta mayor evidencia de que VTA se encuentra modificado en la EP (Alberico *et al.*, 2015). VTA ha estado implicado en una variedad de comportamientos y estados psicopatológicos, que incluyen depresión, ansiedad, y función ejecutiva lo que ayudaría a dilucidar mejor el mecanismo por el cual se genera la sintomatología no motora de la EP.

Se ha descrito que el modelo de rotenona tiene una alta variabilidad y letalidad en el roedor. En el presente trabajo se encontró que al administrar por vía intraperitoneal 0.5, 0.8 y 1 mg/kg en ratón hembra CD-1 reduce la letalidad a 21 y 7 días. La variabilidad en cuanto a la toxicidad entre individuos corrobora lo ya descrito

(Xiong *et al.*, 2012), ya que hubo sujetos experimentales que no presentaron modificaciones bioquímicas y conductuales ante las administraciones del neurotóxico. Y aún con las dificultades que representa esta variabilidad, hemos observado que con la administración de 1 mg/kg a ratonas durante 7 días podemos inducir un modelo toxicidad de ratón que consideramos más replicable, ya que se encontraron ya los efectos iniciales de la toxicidad por rotenona. Uno de los factores importantes es estudiar directamente el bloqueo del complejo I mitocondrial y las modificaciones sobre la actividad mitocondrial. También es importante estudiar si las alteraciones observadas en el presente estudio son permanentes o temporales, así como fortalecer la caracterización con nuevos marcadores que nos permitan dilucidar el mecanismo de toxicidad de la rotenona en la vía nigroestriatal.

## **VIII. Conclusión**

La administración de 1 mg/kg i.p. de rotenona causó hipotermia, una reducción de la TH en el estriado y la SNpc, además de una disminución en el DAT, sin cambios en el VMAT-2 del estriado y un incremento de la inmunoreactividad de  $\alpha$ -Syn-pS129. Al mismo tiempo se observó que las ratonas presentaron una reducción en la exploración y la coordinación motora. Sin embargo con las dosis de 0.5 y de 0.8 mg/kg de rotenona no se logró establecer el modelo de toxicidad.

## **IX. Perspectivas**

1. Evaluar la toxicidad de la administración intraperitoneal de rotenona a 1mg/kg por un periodo de 15 días.
2. Evaluar los niveles de dopamina en el estriado de animales con administración intraperitoneal de rotenona a 1mg/kg por un periodo de 15 días.
3. Determina la función del complejo I mitocondrial en diferentes regiones del SNC posterior a la administración de 1 mg/kg de rotenona.

## X. Referencias

- Ahmadi, F.A., Grammatopoulos, T.N., Poczobutt, A.M., Jones, S.M., Snell, L.D., Das, M. & Zawada, W.M. (2008) Dopamine selectively sensitizes dopaminergic neurons to rotenone-induced apoptosis. *Neurochem Res*, **33**, 886-901.
- Alam, M., Mayerhofer, A. & Schmidt, W.J. (2004) The neurobehavioral changes induced by bilateral rotenone lesion in medial forebrain bundle of rats are reversed by L-DOPA. *Behav Brain Res*, **151**, 117-124.
- Alberico, S.L., Cassell, M.D. & Narayanan, N.S. (2015) The Vulnerable Ventral Tegmental Area in Parkinson's Disease. *Basal Ganglia*, **5**, 51-55.
- Avila Luna, A. (2013) Los ganglios basales: la participación dopaminérgica estriatal. **3**, 19-24.
- Betarbet, R., Canet-Aviles, R.M., Sherer, T.B., Mastroberardino, P.G., McLendon, C., Kim, J.H., Lund, S., Na, H.M., Taylor, G., Bence, N.F., Kopito, R., Seo, B.B., Yagi, T., Yagi, A., Klinefelter, G., Cookson, M.R. & Greenamyre, J.T. (2006) Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: effects of the pesticide rotenone on DJ-1, alpha-synuclein, and the ubiquitin-proteasome system. *Neurobiol Dis*, **22**, 404-420.
- Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V. & Greenamyre, J.T. (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, **3**, 1301-1306.
- Bhurtel, S., Katila, N., Srivastav, S., Neupane, S. & Choi, D.Y. (2019) Mechanistic comparison between MPTP and rotenone neurotoxicity in mice. *Neurotoxicology*, **71**, 113-121.
- Bisbal, M. & Sanchez, M. (2019) Neurotoxicity of the pesticide rotenone on neuronal polarization: a mechanistic approach. *Neural Regen Res*, **14**, 762-766.
- Blandini, F. & Armentero, M.T. (2012) Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J*, **279**, 1156-1166.
- Bolam, J.P. & Pissadaki, E.K. (2012) Living on the edge with too many mouths to feed: why dopamine neurons die. *Mov Disord*, **27**, 1478-1483.

- Bové, J., Prou, D., Perier, C. & Przedborski, S. (2005) Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx*, **2**, 484-494.
- Caboni, P., Sherer, T.B., Zhang, N., Taylor, G., Na, H.M., Greenamyre, J.T. & Casida, J.E. (2004) Rotenone, deguelin, their metabolites, and the rat model of Parkinson's disease. *Chem Res Toxicol*, **17**, 1540-1548.
- Calabresi, P., Picconi, B., Tozzi, A., Ghiglieri, V. & Di Filippo, M. (2014) Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat Neurosci*, **17**, 1022-1030.
- Cannon, J.R., Tapias, V., Na, H.M., Honick, A.S., Drolet, R.E. & Greenamyre, J.T. (2009) A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, **34**, 279-290.
- Choi, B.K., Choi, M.G., Kim, J.Y., Yang, Y., Lai, Y., Kweon, D.H., Lee, N.K. & Shin, Y.K. (2013) Large  $\alpha$ -synuclein oligomers inhibit neuronal SNARE-mediated vesicle docking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 4087-4092.
- Colla, E., Jensen, P.H., Pletnikova, O., Troncoso, J.C., Glabe, C. & Lee, M.K. (2012) Accumulation of toxic  $\alpha$ -synuclein oligomer within endoplasmic reticulum occurs in  $\alpha$ -synucleinopathy in vivo. *J Neurosci*, **32**, 3301-3305.
- Corona, J.C., Gimenez-Cassina, A., Lim, F. & Díaz-Nido, J. (2010) Hexokinase II gene transfer protects against neurodegeneration in the rotenone and MPTP mouse models of Parkinson's disease. *J Neurosci Res*, **88**, 1943-1950.
- Emmanouilidou, E., Stefanis, L. & Vekrellis, K. (2010) Cell-produced alpha-synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. *Neurobiol Aging*, **31**, 953-968.
- Fleming, S.M., Salcedo, J., Hutson, C.B., Rockenstein, E., Masliah, E., Levine, M.S. & Chesselet, M.F. (2006) Behavioral effects of dopaminergic agonists in transgenic mice overexpressing human wildtype alpha-synuclein. *Neuroscience*, **142**, 1245-1253.
- Frucht, S.J. (2004) Parkinson disease: an update. *Neurologist*, **10**, 185-194.
- Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M.S., Shen, J., Takio, K. & Iwatsubo, T. (2002) alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol*, **4**, 160-164.
- German, C.L., Baladi, M.G., McFadden, L.M., Hanson, G.R. & Fleckenstein, A.E. (2015) Regulation of the Dopamine and Vesicular Monoamine Transporters: Pharmacological Targets and Implications for Disease. *Pharmacol Rev*, **67**, 1005-1024.

- Gillies, G.E., Pienaar, I.S., Vohra, S. & Qamhawi, Z. (2014) Sex differences in Parkinson's disease. *Front Neuroendocrinol*, **35**, 370-384.
- Hamani, C. & Lozano, A.M. (2003) Physiology and pathophysiology of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, **991**, 15-21.
- Heikkila, R.E., Nicklas, W.J., Vyas, I. & Duvoisin, R.C. (1985) Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *Neurosci Lett*, **62**, 389-394.
- Heinz, S., Freyberger, A., Lawrenz, B., Schladt, L., Schmuck, G. & Ellinger-Ziegelbauer, H. (2017) Mechanistic Investigations of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone in the Context of Pharmacological and Safety Evaluation. *Sci Rep*, **7**, 45465.
- Inden, M., Kitamura, Y., Abe, M., Tamaki, A., Takata, K. & Taniguchi, T. (2011) Parkinsonian rotenone mouse model: reevaluation of long-term administration of rotenone in C57BL/6 mice. *Biol Pharm Bull*, **34**, 92-96.
- Ji, M., Liang, Y., Gu, Z. & Li, X. (2015) Inhibitory Effects of Amorphigenin on the Mitochondrial Complex I of *Culex pipiens pallens* Coquillett (Diptera: Culicidae). *Int J Mol Sci*, **16**, 19713-19727.
- Johnson, M.E., Lim, Y., Senthilkumaran, M., Zhou, X.F. & Bobrovskaya, L. (2015) Investigation of tyrosine hydroxylase and BDNF in a low-dose rotenone model of Parkinson's disease. *J Chem Neuroanat*, **70**, 33-41.
- Jones, A.J. & Hirst, J. (2013) A spectrophotometric coupled enzyme assay to measure the activity of succinate dehydrogenase. *Anal Biochem*, **442**, 19-23.
- Klein, C. & Schlossmacher, M.G. (2007) Parkinson disease, 10 years after its genetic revolution: multiple clues to a complex disorder. *Neurology*, **69**, 2093-2104.
- Lohr, K.M. & Miller, G.W. (2014) VMAT2 and Parkinson's disease: harnessing the dopamine vesicle. *Expert Rev Neurother*, **14**, 1115-1117.
- Lümmen, P. (1998) Complex I inhibitors as insecticides and acaricides. *Biochim Biophys Acta*, **1364**, 287-296.

- Maries, E., Dass, B., Collier, T.J., Kordower, J.H. & Steece-Collier, K. (2003) The role of alpha-synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models. *Nat Rev Neurosci*, **4**, 727-738.
- Martinez, T.N. & Greenamyre, J.T. (2012) Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*, **16**, 920-934.
- Martínez, R., Gasca, C., Sánchez, Á. & José, O. (2016) Actualización en la enfermedad de Parkinson Parkinson's disease: A Review *Revista Médica Clínica Las Condes*, **27**, 363-379.
- Mitra, S., Chakrabarti, N., Dutta, S.S., Ray, S., Bhattacharya, P., Sinha, P. & Bhattacharyya, A. (2015) Gender-specific brain regional variation of neurons, endogenous estrogen, neuroinflammation and glial cells during rotenone-induced mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, **292**, 46-70.
- Mosharov, E.V., Larsen, K.E., Kanter, E., Phillips, K.A., Wilson, K., Schmitz, Y., Krantz, D.E., Kobayashi, K., Edwards, R.H. & Sulzer, D. (2009) Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and alpha-synuclein causes selective death of substantia nigra neurons. *Neuron*, **62**, 218-229.
- Moustafa, A.A., Chakravarthy, S., Phillips, J.R., Gupta, A., Keri, S., Polner, B., Frank, M.J. & Jahanshahi, M. (2016) Motor symptoms in Parkinson's disease: A unified framework. *Neurosci Biobehav Rev*, **68**, 727-740.
- Muntané, G., Ferrer, I. & Martínez-Vicente, M. (2012)  $\alpha$ -synuclein phosphorylation and truncation are normal events in the adult human brain. *Neuroscience*, **200**, 106-119.
- Murakami, S., Miyazaki, I., Miyoshi, K. & Asanuma, M. (2015) Long-Term Systemic Exposure to Rotenone Induces Central and Peripheral Pathology of Parkinson's Disease in Mice. *Neurochem Res*, **40**, 1165-1178.
- Oueslati, A. (2016) Implication of Alpha-Synuclein Phosphorylation at S129 in Synucleinopathies: What Have We Learned in the Last Decade? *J Parkinsons Dis*, **6**, 39-51.
- Patricio, F., Parra, I., Martínez, I., Pérez-Severiano, F., Montes, S., Aguilera, J., Limón, I.D., Tizabi, Y. & Mendieta, L. (2019) Effectiveness of Fragment C Domain of Tetanus Toxin and Pramipexole in an Animal Model of Parkinson's Disease. *Neurotox Res*, **35**, 699-710.
- Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Djaldetti, R., Liberatore, G., Vila, M., Vukosavic, S. & Almer, G. (2000) The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. *Restor Neurol Neurosci*, **16**, 135-142.

- Ren, Y., Liu, W., Jiang, H., Jiang, Q. & Feng, J. (2005) Selective vulnerability of dopaminergic neurons to microtubule depolymerization. *J Biol Chem*, **280**, 34105-34112.
- Richardson, J.R., Fitsanakis, V., Westerink, R.H.S. & Kanthasamy, A.G. (2019) Neurotoxicity of pesticides. *Acta Neuropathol*, **138**, 343-362.
- Ritz, B.R., Manthripragada, A.D., Costello, S., Lincoln, S.J., Farrer, M.J., Cockburn, M. & Bronstein, J. (2009) Dopamine transporter genetic variants and pesticides in Parkinson's disease. *Environ Health Perspect*, **117**, 964-969.
- Rocha, E.M., De Miranda, B. & Sanders, L.H. (2018) Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, **109**, 249-257.
- Rodríguez Díaz, M., Abdala, P., Barroso-Chinea, P., Obeso, J. & González-Hernández, T. (2001) Motor behavioural changes after intracerebroventricular injection of 6-hydroxydopamine in the rat: an animal model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*, **122**, 79-92.
- Sai, Y., Wu, Q., Le, W., Ye, F., Li, Y. & Dong, Z. (2008) Rotenone-induced PC12 cell toxicity is caused by oxidative stress resulting from altered dopamine metabolism. *Toxicol In Vitro*, **22**, 1461-1468.
- Satta, A., Floris, I., Caboni, P., Cabras, P., Eguaras, M. & Velis, G. (2008) New experimental data on use of rotenone as an acaricide for control of *Varroa destructor* in honey bee colonies. *J Econ Entomol*, **101**, 1075-1080.
- Schmidt, W.J. & Alam, M. (2006) Controversies on new animal models of Parkinson's disease pro and con: the rotenone model of Parkinson's disease (PD). *J Neural Transm Suppl*, 273-276.
- Seibenhener, M.L. & Wooten, M.C. (2015) Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp*, e52434.
- Sharples, S.A., Koblinger, K., Humphreys, J.M. & Whelan, P.J. (2014) Dopamine: a parallel pathway for the modulation of spinal locomotor networks. *Front Neural Circuits*, **8**, 55.
- Soloway, S.B. (1976) Naturally occurring insecticides. *Environ Health Perspect*, **14**, 109-117.
- Subhojit, R. (2017) Author Correction: Synuclein and dopamine: the Bonnie ann Clyde of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*.

- Tabrez, S., Jabir, N.R., Shakil, S., Greig, N.H., Alam, Q., Abuzenadah, A.M., Damanhour, G.A. & Kamal, M.A. (2012) A synopsis on the role of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, **11**, 395-409.
- Thiffault, C., Langston, J.W. & Di Monte, D.A. (2000) Increased striatal dopamine turnover following acute administration of rotenone to mice. *Brain Res*, **885**, 283-288.
- Tieu, K. (2011) A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **1**, a009316.
- Venkatesh Gobi, V., Rajasankar, S., Ramkumar, M., Dhanalakshmi, C., Manivasagam, T., Justin Thenmozhi, A., Essa, M.M., Chidambaram, R. & Kalandar, A. (2018) Agaricus blazei extract abrogates rotenone-induced dopamine depletion and motor deficits by its anti-oxidative and anti-inflammatory properties in Parkinsonic mice. *Nutr Neurosci*, **21**, 657-666.
- Watabe, M. & Nakaki, T. (2008) Mitochondrial complex I inhibitor rotenone inhibits and redistributes vesicular monoamine transporter 2 via nitration in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Mol Pharmacol*, **74**, 933-940.
- Winner, B., Jappelli, R., Maji, S.K., Desplats, P.A., Boyer, L., Aigner, S., Hetzer, C., Loher, T., Vilar, M., Campioni, S., Tzitzilonis, C., Soragni, A., Jessberger, S., Mira, H., Consiglio, A., Pham, E., Masliah, E., Gage, F.H. & Riek, R. (2011) In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 4194-4199.
- Xiong, N., Long, X., Xiong, J., Jia, M., Chen, C., Huang, J., Ghoorah, D., Kong, X., Lin, Z. & Wang, T. (2012) Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models. *Crit Rev Toxicol*, **42**, 613-632.
- Zhang, Y., Wang, Y., Lei, H., Wang, L., Xue, L., Wang, X. & Zhu, X. (2017) Optimized animal model to mimic the reality of stress-induced depression in the clinic. *BMC Psychiatry*, **17**, 171.