



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ALINE AMANDA DA SILVA

Estudo de parâmetros neurocomportamentais de larvas de
zebrafish (*Danio rerio*) expostas à rotenona como modelo para a
Doença de Parkinson

RECIFE

2023

ALINE AMANDA DA SILVA

Estudo de parâmetros neurocomportamentais de larvas de
zebrafish (*Danio rerio*) expostas à rotenona como modelo para a
Doença de Parkinson

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Orientador:

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena

RECIFE

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586e

Silva, Aline Amanda da

Estudo de parâmetros neurocomportamentais de larvas de zebrafish (*Danio rerio*) expostas à rotenona como modelo para a Doença de Parkinson / Aline Amanda da Silva. - 2023.

51 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Pabyton Goncalves Cadena.

Inclui referências e anexo(s).

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2023.

1. Doença de Parkinson. 2. Zebrafish. 3. Rotenona. 4. Comportamento animal. I. Cadena, Prof. Dr. Pabyton Goncalves, orient. II. Título

CDD 574

ALINE AMANDA DA SILVA

Estudo de parâmetros neurocomportamentais de larvas de
zebrafish (*Danio rerio*) expostas à rotenona como modelo para a
Doença de Parkinson

Área de concentração: Ciências Biológicas

Data da defesa: 21/09/2023

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena (Presidente)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza (1° titular)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. André Lucas Corrêa de Andrade (2° titular)
Universidade Federal de Pernambuco

MSc. Niely Priscila Correia da Silva (Suplente)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico

À Deus, aos meus pais Marliene e Marcos, aos meus irmãos Augusto e Laryssa e aos meus avós (*in memoriam*): Severino Francisco, Pedro Otaviano e Severina Cavalcanti.

AGRADECIMENTOS

À Deus, O Autor e Consumador da minha fé. Ele que tem sido a minha esperança nos momentos mais difíceis da minha vida.

Aos meus pais Marliene e Marcos por terem contribuído para que eu pudesse chegar até aqui. Agradeço em especial à minha mãe que é minha amiga, minha confidente, meu porto seguro e tem sido a minha maior fonte de incentivo durante todos esses anos da minha existência. Obrigada por sempre estar na torcida por mim, mãe!

Aos meus irmãos Augusto e Laryssa por serem essenciais em minha vida.

Ao Walberto Barbosa, o meu professor de Química durante o ensino médio. Sempre serei grata por ser uma das minhas maiores inspirações, por acreditar em mim e por suas palavras de apoio em diversos momentos da minha caminhada. Obrigada por sempre me acolher nos momentos de desespero.

Ao Ricardson Falcão por ter me agraciado com toda a sua paciência, dedicação e comprometimento. Nossas reflexões contribuíram bastante para a minha evolução e superação de inúmeros dilemas. Sem a sua ajuda eu teria perdido o uso da razão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena por ter me concedido a oportunidade de fazer parte da equipe do LECA. Eu sou imensamente grata por toda a sua paciência, por ter me instruído e contribuído fortemente para a minha formação. É uma honra tê-lo como meu orientador.

À equipe do LECA por todo o acolhimento; em especial à Renatta Silva por ter segurado a minha mão em diversos momentos, me fazendo sentir capaz de realizar qualquer coisa. Também sou especialmente grata a Jadson e André pela solicitude e por terem sanado as minhas dúvidas em incontáveis momentos.

À Letícia Araújo por toda a sua ajuda e apoio. Muito obrigada por não ter deixado eu me sentir sozinha durante a reta final. Seu coração é gigante!

À Stefanny Arielle por ter sido a minha companheira de surtos diários.

À Sâmara por ter me direcionado na parte mais difícil deste trabalho.

Aos meus amigos da graduação: Lucas Vinnicio, Danilo Zelaquett, Márcio Rafael, José Fernando e a minha amiga Aline Bomfin. Muito obrigada por todo o carinho e por terem me proporcionado momentos memoráveis durante a minha trajetória na UFRPE.

Agradeço à Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Aos membros da banca examinadora.

E ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Quando for a hora certa, Eu, o Senhor farei acontecer.”

Isaiás 60:22

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - *Zebrafish* adulto (linhagem selvagem) obtido de criadouros comerciais.....7
- Figura 2** - Larva de *zebrafish* com 144 hpf (vista dorsal e lateral) obtida do plantel próprio do biotério.....9
- Figura 3** - Aquários confeccionados em policarbonato utilizados para reprodução do *zebrafish* (Zebclean, Alesco)20
- Figura 4** - O percentual de sobrevivência das larvas de *zebrafish* foi significativamente reduzido ($p < 0,05$) nos grupos expostos às concentrações de 12 e 15 $\mu\text{g/L}$ de rotenona.....22
- Figura 5** - A tigmotaxia foi significativamente afetada ($p < 0,05$) em larvas de *zebrafish* expostas às concentrações maiores e iguais a 11 $\mu\text{g/L}$ de rotenona.....23
- Figura 6** - Larvas de *zebrafish* apresentaram reduções significativas ($p < 0,05$) na exibição de comportamento de fuga em resposta ao toque quando expostas às concentrações maiores e iguais a 11 $\mu\text{g/L}$ de rotenona.....24
- Figura 7** - Larvas de *zebrafish* apresentaram reduções significativas ($p < 0,05$) na resposta de agrupamento em concentrações maiores e iguais a 11 $\mu\text{g/L}$ de rotenona.....26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de Variância

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

DMSO - Dimetilsulfóxido

DP - Doença de Parkinson

dpf - Dias pós-fertilização

DP-like - Doença de Parkinson-like

hpf - Horas pós-fertilização

MPDP+ - 1-metil-4-fenil-2,3-di-hidropiridínio

MPP+ - 1-metil-4-fenilpiridina

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

OCDE - Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

6 - OHDA - 6-hidroxiopamina

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum no mundo. Esta afeta predominantemente a população idosa através da manifestação de sintomas motores e não motores que comprometem a qualidade de vida dos indivíduos acometidos. Atualmente, os tratamentos existentes visam apenas a atenuação dos sintomas motores e causam efeitos adversos a longo prazo. Diante disso, a utilização de modelos animais que proporcionem uma condição neuroquímica e sintomatológica equivalente à DP é indispensável para o estudo da DP e desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. A rotenona é uma molécula orgânica que tem sido utilizada como indutora de atributos clínicos de *Parkinson-like*; a exposição crônica a essa molécula ocasiona a morte de neurônios dopaminérgicos e fenótipos comportamentais pertinentes a DP em modelos animais. No presente estudo, foram utilizadas larvas de *zebrafish* como modelo animal. A manutenção dos animais, obtenção dos ovos e experimentos foram realizados no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, sendo previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais, e foi utilizado o protocolo da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE 236, 2013). Utilizamos 7 grupos experimentais: 1 grupo controle de DMSO e 6 grupos com diferentes concentrações de rotenona (5, 10, 11, 11,25, 12 e 15 µg/L). Contamos com 8 repetições e 15 indivíduos por grupo (N = 840), sendo expostos 72 horas pós-fertilização (hpf) até 144 hpf. Foram avaliados parâmetros comportamentais através dos testes: Tigmotaxia, Sensibilidade ao Toque e Bolas Saltitantes. Foi possível observar alterações significativas no comportamento das larvas expostas às concentrações maiores e iguais a 11 µg/L em todos os testes realizados. De acordo com os resultados obtidos, concluímos que foi possível avaliar parâmetros comportamentais de larvas de *zebrafish* expostas à rotenona, uma vez que o modelo utilizado se mostrou adequado para analisar alterações comportamentais pertinentes a DP. O tempo de início e duração de exposição, bem como as quatro maiores concentrações utilizadas (11, 11,25, 12 e 15 µg/L) causaram alterações comportamentais semelhantes aos sintomas da DP nos testes realizados. Considerando que o modelo utilizado se mostrou apropriado, existe a possibilidade de aplicá-lo para rastrear compostos que possam contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da doença e para a melhora da qualidade de vida dos indivíduos afetados.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, *zebrafish*, rotenona, comportamento animal.

ABSTRACT

Parkinson's Disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease worldwide. It predominantly affects the elderly population through the manifestation of motor and non-motor symptoms that compromise the quality of life of affected individuals. Due to its complex pathophysiology, there is difficulty in developing an effective treatment. Therefore, the use of animal models that provide a neurochemical and symptomatic condition equivalent to PD is indispensable for the study of PD and the development of new therapeutic alternatives. Rotenone is an organic molecule that has been used as an inducer of clinical Parkinson-like attributes; chronic exposure to this molecule leads to the death of dopaminergic neurons and relevant behavioral phenotypes in animal models. In the present study, *zebrafish* larvae were used as an animal model. The maintenance of the animals, egg collection, and experiments were conducted in the Laboratory of Eco-physiology and Animal Behavior at the Federal Rural University of Pernambuco, previously approved by the Animal Ethics Committee, and the protocol of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD 236, 2013) was followed. We used 7 experimental groups: 1 DMSO control group and 6 groups with different concentrations of rotenone (5, 10, 11, 11.25, 12, and 15 $\mu\text{g/L}$). There were 8 repetitions and 15 individuals per group ($N = 840$), exposed from 72 hours post-fertilization (hpf) to 144 hpf. Behavioral parameters were evaluated through the following tests: Thigmotaxis, Touch Sensitivity, and Bouncy Balls. Significant changes in the behavior of larvae exposed to concentrations equal to or greater than 11 $\mu\text{g/L}$ were observed in all tests performed. Based on the results obtained, we conclude that it was possible to assess the behavioral parameters of *zebrafish* larvae exposed to rotenone, as the model used proved suitable for analyzing PD-like symptoms. The onset time and duration of exposure and the four highest concentrations used (11, 11.25, 12, and 15 $\mu\text{g/L}$) caused behavioral changes like PD symptoms in the tests performed. Considering that the model used was appropriate, there is the possibility of applying it to screen compounds that may contribute to the development of new therapeutic alternatives for the treatment of the disease and the improvement of the quality of life of affected individuals.

Keywords: Parkinson's disease, *zebrafish*, rotenone, animal behavior.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 DOENÇA DE PARKINSON	4
2.2. MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DA DP	5
2.2.1. <i>ZEBRAFISH (Danio rerio)</i> COMO MODELO ANIMAL.....	6
2.2.1.1 UTILIZAÇÃO DO <i>ZEBRAFISH (Danio rerio)</i> PARA ESTUDOS SOBRE DP.....	9
2.3 ROTENONA COMO INDUTORA DE SINTOMAS DP-like.....	11
2.4 OUTRAS NEUROTOXINAS UTILIZADAS PARA INDUÇÃO DE SINTOMAS DP-like.....	13
2.5 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DO <i>ZEBRAFISH (Danio rerio)</i> COMO MODELO PARA A DP.....	17
3 OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4 METODOLOGIA	19
4.1 MANUTENÇÃO DO <i>ZEBRAFISH (Danio rerio)</i> E COLETA DOS EMBRIÕES.....	19
4.2 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE ROTENONA, EXPOSIÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS	20
4.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS	21
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	22
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6 CONCLUSÕES.....	28
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
ANEXO - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS PROTOCOLO 3581030221.....	39

1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressiva patologicamente caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra compacta pertencente ao mesencéfalo (BUCUR; PAPAGNO, 2023). Ademais, possui prevalência de 1-2% e acomete majoritariamente homens e indivíduos com idade acima de 65 anos (OU et al., 2021). Em razão da neurodegeneração dopaminérgica, há redução dos níveis do neurotransmissor dopamina resultando em sintomas motores como: tremor de repouso, bradicinesia, rigidez muscular e instabilidade postural (BUCUR; PAPAGNO, 2023). No entanto, a manifestação da DP não envolve apenas sintomas motores, sintomas não motores como: comprometimento cognitivo, distúrbios do sono, hiposmia, depressão e ansiedade também podem ser observados (KUMARESAN; KHAN, 2021).

Até o momento, não existe tratamento definitivo para a DP; os tratamentos existentes amenizam apenas os sintomas motores e não são capazes de atuar na regressão da doença, além de causarem efeitos adversos a longo prazo (LIU et al., 2019). Isso porque a maioria dos distúrbios do movimento apresentam etiologia e mecanismos patológicos complexos, dificultando, além de outros aspectos, o desenvolvimento de compostos terapêuticos eficazes para o tratamento da doença (VAZ et al., 2018). Diante disso, a utilização de modelos animais que proporcionem uma condição neuroquímica e sintomatológica equivalente à DP, sendo esta denominada Doença de Parkinson-like (DP-like), é indispensável para o estudo, compreensão da fisiopatologia da doença (WANG et al., 2017; ANDRADE et al., 2022; ROCHA et al., 2022) e, conseqüentemente, o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas (DONGJIE et al., 2022; NAJIB et al., 2023).

Neste contexto, o *zebrafish* (*Danio rerio*), pequeno peixe teleosteo, tem sido amplamente empregado nas pesquisas em âmbito mundial, e isso deve-se às características vantajosas que este possui, como: pequeno porte, fácil manutenção, baixo custo de criação, alta taxa reprodutiva e fecundação externa. Além disso, adequa-se a ensaios *in vivo* em larga escala por possuir alta fecundidade e curto ciclo de vida, o que possibilita a utilização de uma grande quantidade de grupos experimentais de uma só vez, fornecendo resultados estatisticamente confiáveis (FUKUSHIMA et al., 2020). Ainda, vale ressaltar que o *zebrafish* possui homologia genética, fisiológica, anatômica e comportamental com o ser humano, o que assegura sua eficiência no estudo de doenças humanas (BASNET et al., 2019).

Adicionado a isto, a homologia fisiológica e anatômica entre o *zebrafish* e o ser humano é evidenciada na maioria dos órgãos, incluindo o sistema nervoso. A estrutura

anatômica básica, as populações celulares e a química do *zebrafish* e do sistema nervoso humano são evolutivamente conservadas. O sistema nervoso do *zebrafish* é anatomicamente dividido em cérebro anterior, médio e posterior, incluindo o diencéfalo, o telencéfalo, cerebelo e medula espinhal (VAZ et al., 2018). Ainda, foi sugerido que o diencéfalo ventral do *zebrafish* é uma região funcionalmente homóloga à substância negra humana, na qual a patogênese da DP se desenvolve (SON et al 2003). Ademais, os neurônios dopaminérgicos já são detectados no diencéfalo dos embriões de *zebrafish* 24 hpf (LAM et al., 2005), e as projeções dopaminérgicas estão completamente formadas entre 3 e 4 dias pós-fertilização (dpf) (DU et al., 2016), o que viabiliza o estudo de doenças associadas aos neurônios dopaminérgicos, como a DP (KALYN et al., 2019).

Diante do exposto, o *zebrafish* tem sido utilizado como modelo animal para indução à DP-like através da administração de neurotoxinas padronizadas capazes de atuar no sistema nervoso central do animal ocasionando fenótipos neuroquímicos e comportamentais pertinentes a DP (KHOTIMAH et al., 2017; WANG et al., 2017; KALYN et al., 2019). Dentre as substâncias mais utilizadas para mimetizar a DP, pode-se mencionar o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP), a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), o paraquat e a rotenona (RAZALI et al., 2021; THIRUGNANAM; SANTHAKUMAR, 2022; BRÍÑEZ-GALLEGO et al., 2023).

A rotenona é um composto natural lipofílico usado como pesticida e comumente utilizado como agente indutor da DP (ALGHAMDI et al., 2023). Devido sua lipofilicidade, a rotenona atravessa livremente a barreira hematoencefálica e membranas celulares, acometendo diversas organelas como a mitocôndria, por exemplo (BETARBET et al., 2000; AZIMULLAH et al., 2023). Como resultado, recapitula características clínicas e patológicas da DP primariamente através da inibição do complexo mitocondrial I (ROCHA et al., 2022). Por exemplo, uma das características patológicas da DP é a degeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos, que foi associada comportamentalmente à hipocinesia e rigidez; alguns dos sintomas da doença (BETARBET et al., 2000).

Utilizando o *zebrafish* como modelo para DP-like induzida por rotenona, há a possibilidade de que a exposição ocorra por imersão, havendo a redução da necessidade de procedimentos invasivos, como por exemplo, por meio de injeção intracerebral, como na modelagem da DP-like com 6-OHDA em *zebrafish* adulto (KHOTIMAH et al., 2015; VIJAYANATHAN et al. 2017).

Adicionalmente, a presença de condições semelhantes à DP no *zebrafish* exposto à rotenona pode ser averiguada através da avaliação de parâmetros comportamentais e

locomotores estabelecidos no tocante ao quadro clínico da doença (WANG et al., 2017; ANDRADE et al., 2022). E no que se refere a comportamento, assim como os humanos, o *zebrafish* apresenta um repertório comportamental complexo, incluindo comportamento social, ansiedade, aprendizagem e memória, e comportamento de defesa, o que pode ser útil para modelar doenças neurológicas e psiquiátricas. Ainda, assim como os adultos, as larvas de *zebrafish* exibem comportamentos relevantes para a neurofarmacologia (BASNET et al., 2019). Nesse contexto, alguns testes comportamentais realizados com o *zebrafish* podem ser ferramentas importantes para o estudo de distúrbios que refletem no comportamento (KALYN et al., 2019; CADENA et al., 2020a; ANDRADE et al., 2022), uma vez que fenótipos comportamentais do *zebrafish* podem proporcionar informações relevantes sobre função cerebral normal e patológica (KALUEFF et al., 2013).

Adicionalmente, dada a toxicidade da substância utilizada no presente estudo para induzir fenótipos comportamentais pertinentes a DP, vale acrescentar que de acordo com Melo et al. (2015) o limiar entre as concentrações de rotenona capazes de causar efeitos fisiológicos e as concentrações ineficazes é bastante estreito. Isto fundamenta a utilização de diferentes concentrações de rotenona com pequenas variações entre estas com o intuito de provocar alterações observáveis sem ocasionar a morte dos animais. Ainda, no que diz respeito ao regime de exposição às substâncias indutoras de DP-like no *zebrafish*, Kalyn et al. (2019) sugeriram que a falta de padronização no tempo de início de exposição a essas substâncias produziu resultados conflituosos. Isso porque maior parte dos estudos iniciaram a exposição 24 hpf e continuaram até 4 ou 7 dpf, tornando difícil discernir se as alterações nos neurônios dopaminérgicos resultaram da morte celular, comprometimento da diferenciação neurodopaminérgica ou neurogênese retardada. Sendo assim, de acordo com Kalyn et al. (2019), o tempo de início de exposição deve ser selecionado considerando o evitamento da inibição da neurogênese do *zebrafish*.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros comportamentais de larvas de *zebrafish* (linhagem selvagem) expostas a diferentes concentrações de rotenona a partir de 72 hpf (3 dpf). Este regime de exposição visa assegurar um desenvolvimento neurodopaminérgico avançado e a garantia da avaliação de alterações comportamentais decorrentes da neurodegeneração dopaminérgica pela ação da rotenona.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA DE PARKINSON

A DP foi descrita com o nome de “paralisia agitante” há mais de 200 anos pelo médico inglês James Parkinson em seu ensaio intitulado “*An Essay on the Shaking Palsy*” (OBESO et al., 2017). Depois do Alzheimer, a DP é a enfermidade neurodegenerativa mais comum no mundo, possuindo prevalência global de 1-2% (ÜNAL; EMEKLI-ALTURFAN, 2019), acometendo majoritariamente indivíduos do sexo masculino e pessoas com idade acima de 65 anos (OU et al., 2021). Com o aumento da expectativa de vida, e conseqüentemente, o envelhecimento da população, o número de indivíduos acometidos por essa condição tende a aumentar, havendo uma projeção mundial de excedência aos 12 milhões de casos até 2040 (DORSEY; BLOEM, 2018).

A DP consiste em uma desordem neurodegenerativa e progressiva predominantemente resultante da perda de neurônios dopaminérgicos da porção compacta (dorsal) da substância negra pertencente ao mesencéfalo (HAYES, 2019). Ademais, a neurodegeneração é acompanhada pelo acúmulo intraneural de corpúsculos de Lewy, compostos em sua maior parte pela proteína α -sinucleína dobrada incorretamente; sendo este o correlato patológico característico da DP (DICKSON, 2018).

No que se refere ao declínio de neurônios dopaminérgicos, o neurotransmissor dopamina passa a ser produzido de forma insuficiente, resultando principalmente em sintomas motores que incluem tremor de repouso, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural (RYMAN; POSTON, 2020). Além dos sintomas motores ocasionados pela redução dos níveis do neurotransmissor dopamina, a DP engloba manifestações neuropsiquiátricas e outras manifestações não motoras que acarretam a diminuição da qualidade de vida do indivíduo (JÚNIOR et al., 2022). Alguns sintomas não motores como dificuldade de concentração, distúrbios do sono e hiposmia podem manifestar-se alguns anos antes dos sintomas motores (MADSEN et al., 2021). Além disso, déficits cognitivos, quadros de depressão e ansiedade também podem ser observados (DRAOUI et al., 2020).

No que diz respeito a etiologia da DP, esta tem se mostrado complexa, podendo estar associada a combinação de fatores genéticos e ambientais, como a exposição a pesticidas, produtos químicos e metais (CABREIRA; MASSANO, 2019; IBARRA-GUTIÉRREZ et al., 2023). Igualmente, em razão da diversidade dos quadros clínicos apresentados pelos pacientes, subentende-se que sua fisiopatologia também é complexa, estando relacionada à interação de diferentes mecanismos moleculares, como estresse oxidativo, disfunção

mitocondrial, neuroinflamação, disfunção do sistema ubiquitina-proteassoma, ruptura de microtúbulos e defeitos no transporte axonal (IBARRA-GUTIÉRREZ et al., 2023).

Adicionalmente, recursos que resultem na regressão da DP ainda são inexistentes, e os tratamentos disponíveis amenizam apenas os sintomas motores através da reposição de dopamina (DORSEY et al., 2018). Ademais, os agentes terapêuticos utilizados para esses fins geralmente causam efeitos adversos a longo prazo, como é o caso da L-3,4-dioxifenilalanina (levodopa) (LIU et al., 2019). Diante disso, alguns estudos têm sido realizados com os objetivos de investigar novas possibilidades terapêuticas para a DP e aprimorar os tratamentos já existentes para que seja possível otimizar os efeitos destes limitando as reações adversas (NASKAR et al., 2021).

2.2. MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DA DP

Tendo em vista a complexidade etiofisiopatológica da DP e os efeitos adversos dos regimes terapêuticos sintomáticos utilizados atualmente, modelos animais têm sido empregados no estudo de diversos aspectos da doença. Esses feitos objetivam o entendimento da patogênese, e conseqüentemente, o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas (BETARBET et al., 2000; CHIA et al., 2020; NAJIB et al., 2023). Ainda, os estudos pré-clínicos são pré-requisitos indispensáveis para ensaios clínicos de grande escala (LARIJANI et al., 2019).

Frente a isso, é necessário escolher a espécie animal adequada considerando similaridades anatômicas, fisiológicas, comportamentais e genéticas com o ser humano (POTASHKIN et al., 2011). Ademais, no que diz respeito a aspectos experimentais, características como sensibilidade a um composto químico específico e disponibilidade tornam uma espécie viável para o estudo da DP (LARIJANI et al., 2019). Diante do exposto, três grandes grupos de animais têm sido comumente utilizados para o estudo da DP: roedores, primatas não-humanos e espécies não-mamíferas, como o nematoide *Caenorhabditis elegans* e a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* (CHIA et al., 2020).

Na pesquisa médica, os primatas não-humanos desempenharam um papel fundamental no fornecimento de informações relevantes sobre os mecanismos de doenças humanas, uma vez que estão estritamente relacionados aos humanos em relação a aspectos genéticos e fisiológicos. Entretanto, as pesquisas com esses modelos demandam muito trabalho e despesas, bem como questões éticas (PHILLIPS et al., 2014). Diante do exposto, apenas um pequeno percentual dos estudos de DP utilizou os primatas não-humanos como modelo (GROW et al., 2016; CHIA et al., 2020).

Os roedores são amplamente empregados como modelos animais pela viabilidade de cuidados em ambiente de laboratório, disponibilidade de cepas de animais transgênicos, e protocolos bem estabelecidos. Além disso, apresentam diversas características importantes durante a modelagem da DP, como: déficits motores diretamente correlacionados a neurodegeneração dopaminérgica, ampla gama de testes disponíveis para verificação das alterações comportamentais ocasionadas pela indução da condição patológica, entre outros (MEREDITH; KANG, 2006; SEDELIS et al., 2001). No entanto, apesar do pequeno porte, da similaridade desses modelos com o ser humano e das vantagens supracitadas, os custos para manutenção são relativamente altos e a produção de linhagens transgênicas desses animais demanda alto suporte e infraestrutura (LIESCHKE; CURRIE, 2007).

Não obstante a isso, modelos invertebrados já mencionados como *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster* têm sido utilizados há vários anos como modelos para a pesquisa médica, e além de possuírem diversos processos biológicos e muitos genes conservados com os mamíferos, estes possuem baixo custo de manutenção (SÉGALAT, 2007). Nesse contexto, estes invertebrados emergiram como modelos relevantes para ensaios *in vivo* em larga escala, como por exemplo, a descoberta de medicamentos e o estudo da DP. Sobre este último, esses modelos forneceram informações sobre vias relevantes na patogênese da doença (CORREA et al., 2023). No entanto, estes não possuem algumas estruturas e órgãos envolvidos na patogênese de doenças humanas, portanto, o papel desses animais durante a modelagem é limitado (LIESCHKE; CURRIE, 2007).

Diante disso, um modelo não-mamífero alternativo aos invertebrados é o *Danio rerio*, uma espécie de peixe teleósteo comumente conhecida como *zebrafish*. Este tornou-se bastante relevante para o estudo de doenças humanas nos últimos anos, uma vez que há a combinação das vantagens básicas que permitem os ensaios *in vivo* em larga escala proporcionada pelos invertebrados com a semelhança que o *zebrafish* possui com os mamíferos (SPENCE et al., 2008; CHIA et al 2020; DOYLE; CROLL, 2022).

2.2.1. ZEBRAFISH (*Danio rerio*) COMO MODELO ANIMAL

O *zebrafish* (*Danio rerio*) (Figura 1), pequeno peixe tropical de água doce pertencente à classe Actinopterygii e família Cyprinidae, é um teleósteo nativo da Índia, Paquistão, Bangladesh, Nepal e outros países do sul da Ásia (SPENCE et al., 2008; DAMMSKI et al., 2022; LIU, 2023). Sua denominação é proveniente das listras que possui do dorso à barbatana anal, sendo estas semelhantes às listras de uma zebra. Os machos são estreitos, de coloração mais escura e listras brilhantes, enquanto as fêmeas possuem abdômen eminente, coloração

mais clara e atingem a maturidade sexual por volta de 4 meses após a eclosão. Ainda, são peixes de pequeno porte e possuem entre 3 e 5 cm de comprimento (LIU, 2023).



Figura 1 - *Zebrafish* adulto (linhagem selvagem) obtido de criadouros comerciais. **Fonte:** Própria

A priori, era usado apenas na piscicultura ornamental, no entanto, foi estabelecido com sucesso como sistema modelo de vertebrados na década de 1960, graças ao trabalho do Biólogo George Streisinger (CANEDO et al., 2022). Atualmente, tem sido amplamente empregado nas pesquisas em âmbito mundial, e isso se deve às diversas características favoráveis que possui para o cenário científico. Dentre essas características vantajosas estão: pequeno porte, fácil manutenção, baixo custo de criação, alta taxa reprodutiva (aproximadamente 200 ovos por postura), fecundação externa e breve ciclo de vida. Sua alta fecundidade e curto ciclo reprodutivo fazem dele um modelo adequado para ensaios *in vivo* em larga escala pela possibilidade da utilização de muitos grupos experimentais de uma só vez, proporcionando resultados estatisticamente confiáveis (FUKUSHIMA et al., 2020).

Adicionalmente, o *zebrafish* apresenta sensibilidade a compostos químicos por ser capaz de absorvê-los rapidamente quando adicionados à água, havendo a acumulação destes em diferentes tecidos (FUKUSHIMA et al., 2020). Outra vantagem da utilização do *zebrafish* é a transparência óptica, o que possibilita a observação direta de processos fisiológicos *in vivo* em tempo real (VAZ et al, 2018). Diante disso, deformações pela exposição a compostos químicos, medicamentos e vacinas em fase de teste são facilmente observadas (FUKUSHIMA et al., 2020).

Em 2013, o genoma do *zebrafish* foi totalmente sequenciado, revelando mais de 70% de homologia genética com o ser humano, além de elevado grau de conservação nas propriedades funcionais de muitas proteínas codificadas (HOWE et al., 2013). Assim, a pesquisa com o *zebrafish* também contribui fortemente para a determinação de mutações e compreensão das funções de genes específicos em doenças humanas (DOOLEY; ZON, 2000; SCHNEIDER et al., 2009; HOWE et al., 2013; HU et al., 2017). Por exemplo, num estudo realizado por Hu et al. (2017) observou-se que o gene ATG5 do *zebrafish* e dos humanos se expressam de forma similar durante uma condição patológica humana como a DP induzida quimicamente no *zebrafish*. Avaliando o papel do gene ATG5 durante a modelagem da doença no *zebrafish*, foi possível chegar à conclusão da função que este mesmo gene exerce durante a manifestação da patologia em humanos.

Como um modelo vertebrado, o *zebrafish* compartilha algumas estruturas anatômicas semelhantes com os mamíferos (rins, cérebro, fígado, intestino, coração, coluna vertebral, olhos, boca dentre outros), que mesmo sendo adaptadas ao ambiente aquático, possuem fisiologia e funções bastante similares (FUKUSHIMA et al., 2020). Em vista disso, o *zebrafish* mostra-se passível no estudo de distúrbios hematopoiéticos, cardiovasculares, renais entre outros (DOOLEY; ZON, 2000). Ademais, estudos recentes mostraram o potencial do *zebrafish* como modelo para o estudo de doenças crônicas como diabetes (CAO et al., 2023; LIN et al., 2023), câncer (AL-HAMALY et al., 2023), além de doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer (SALEEM; KANNAN, 2019) e DP (ANDRADE et al., 2022). Ainda, há a possibilidade de pesquisas de processos infecciosos no peixe, uma vez que há a presença de elementos de imunidade inata e adaptativa, e o *zebrafish* é sensível a ação de bactérias, vírus e fungos (SILVEIRA et al., 2012; PATEL et al., 2023).

Além de similaridade anatômica, fisiológica e genética, o *zebrafish* apresenta repertório comportamental semelhante a alguns comportamentos humanos, como: aprendizado, memória, comportamento social, defesa, estresse e ansiedade (ABREU et al., 2019). Ainda, estudos recentes constataram respostas comportamentais dependentes do contexto em que o *zebrafish* se encontra. Por exemplo, quando expostos a estímulos (químicos ou mecânicos), este teleósteo tende a apresentar uma gama de comportamentos mensuráveis bem estabelecidos (KALUEFF et al., 2014; GIACOMINI et al., 2016; ZIMMERMAN et al., 2016), sendo possível correlacioná-los às alterações moleculares típicas de determinadas patologias. Ainda, a larva do *zebrafish* (Figura 2) exibe semelhança com o peixe adulto e outros vertebrados no que se refere a comportamentos-chave usados em

neurofarmacologia, como ansiedade e estresse (BASNET et al., 2019), podendo representar uma alternativa ao uso dos adultos.



Figura 2: Larva de *zebrafish* com 144 hpf (vista dorsal e lateral) obtida do plantel próprio do biotério.

Fonte: Equipe LECA - UFRPE

2.2.1.1 UTILIZAÇÃO DO ZEBRAFISH (*Danio rerio*) PARA ESTUDOS SOBRE DP

A indisponibilidade de cérebros humanos levou os cientistas a desenvolverem vários modelos experimentais utilizando animais para mimetizar diversos aspectos da DP, e dentre os modelos animais utilizados ao longo dos séculos, pode-se citar o *zebrafish*. Este teleosteo é um dos modelos não-mamíferos que apresentam vantagens pertinentes a facilidade de manipulação genética, curto ciclo de vida, baixo custo de manutenção e neuropatologia e comportamentos bem estabelecidos. Diante disso, adequa-se a triagem de compostos químicos em larga escala, sendo relevante em diversas áreas de pesquisa, inclusive no estudo da DP (CHIA et al, 2020).

Adicionalmente, a homologia anatômica e fisiológica entre o ser humano e o *zebrafish* ocorre na maioria dos órgãos, inclusive no sistema nervoso, dividido em cérebro anterior, médio e posterior, incluindo diencéfalo, telencéfalo, cerebelo e medula espinhal (LIESCHKE; CURRIE, 2007; KALUEFF et al., 2014a). Ainda, propõe-se que o telencéfalo ventral do peixe seja equivalente ao corpo estriado humano (RAZALI et al., 2021). Além disso, a identificação de uma massa de neurônios dopaminérgicos semelhante às da substância negra

humana em larvas de *zebrafish* reforça o potencial de aplicabilidade do peixe quanto ao estudo de doenças humanas, como a DP (DONGJIE et al., 2022).

Vale ressaltar que os sintomas motores da DP em humanos estão ligados à redução da sinalização de dopamina entre a substância negra e o corpo estriado causada pela perda neuronal dopaminérgica (COOPER; VAN RAAMSDONK, 2018). Assim sendo, as relações entre estruturas anatômicas e aspectos neuroquímicos entre humanos e *zebrafish* são fatores que podem justificar a incorporação do peixe aos mecanismos patológicos da DP.

Além disso, a rapidez no desenvolvimento neurológico e transparência óptica durante a embriogênese do *zebrafish* viabilizam o estudo de doenças associadas a neurônios dopaminérgicos (KALYN et al., 2019), uma vez que a projeção dopaminérgica nesses animais está completamente formada entre 3 e 4 dpf (DU et al., 2016) e os processos celulares e fisiológicos podem ser facilmente observados por serem transparentes (VAZ et al., 2018).

Outrossim, o *zebrafish* pode apresentar alterações neuroquímicas e comportamentais quando expostos a alguns compostos químicos que possam ocasionar a manifestação de fenótipos pertinentes à DP (KHOTIMAH et al., 2015; WANG et al., 2017). E no que se refere a comportamento, assim como os humanos, o *zebrafish* apresenta um repertório comportamental referente a uma série de processos cognitivos como: aprendizado, memória, medo, ansiedade, percepção, habilidades sociais e padrão de sono (OLIVEIRA, 2013; CADENA et al., 2020a).

Ademais, as alterações nos padrões de comportamento do *zebrafish* sob a administração de compostos químicos podem ser averiguadas por meio de testes comportamentais. Por exemplo, as alterações referentes à DP-like podem ser mensuradas no *zebrafish* através de testes que avaliam parâmetros de atividade locomotora, como a distância total percorrida e a velocidade média (KALYN et al., 2019; ANDRADE et al., 2022).

Adicionalmente, os sintomas semelhantes a DP (DP-like) podem ser ocasionados no *zebrafish* através da administração de neurotoxinas análogas a dopamina, como o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP) e a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), além de agrotóxicos, como a rotenona e o paraquat (KALYN et al., 2019; CHIA et al., 2020; RAZALI et al., 2021). Ademais, dada a importância dos genes na patogênese da DP, também é possível mimetizá-la utilizando o *zebrafish* como modelo animal a partir da formação de linhagens transgênicas do peixe. Esse processo consiste em conduzir o material genético do animal à expressão de genes relacionados ao desenvolvimento da DP (RAZALI et al., 2021). No entanto, os estudos sobre os mecanismos patológicos subjacentes ao desenvolvimento da DP consideram mais adequado o uso dos modelos induzidos quimicamente. Isso porque a

interação entre as funções dos neurônios dopaminérgicos e a atividade oxidativa no cérebro continua sendo um campo intrigante de possíveis mecanismos de regulação (ROBEA et al., 2020).

2.3 ROTENONA COMO INDUTORA DE SINTOMAS DP-like

A rotenona é um composto natural lipofílico extraído de raízes, sementes e caules de leguminosas, proveniente principalmente das espécies dos gêneros *Lonchocarpus* e *Derris* (HEINZ et al., 2017; ANGUICHAMY; MUTHUVEL, 2023). Esta toxina natural tem sido bastante utilizada na aquicultura para o controle e erradicação de peixes indesejáveis, sendo empregada também na agricultura para o controle de pragas em hortas (RADAD et al., 2019). Ademais, a rotenona é considerada pela OMS um pesticida moderadamente perigoso, e em razão de sua toxicidade, o uso da rotenona foi restringido nos Estados Unidos e proibido na União Europeia (INNOS; HICKEY, 2021).

No que se refere a causa da DP, diversos fatores indicam uma etiopatogênese heterogênea, fundamentada na interação genética-ambiente (CABREIRA; MASSANO, 2019). Neste contexto, estudos epidemiológicos mencionam a correlação entre a exposição a pesticidas e o aumento do risco de manifestação da DP (CABREIRA; MASSANO, 2019; DE OLIVEIRA et al., 2020). Além disso, estudos toxicológicos sustentam essa hipótese por haver evidências de neurotoxicidade fornecidas pelo contato de animais e células com pesticidas. Ainda, as razões pelas quais os pesticidas podem estar associados a patogênese da DP integra estresse oxidativo e inibição do complexo mitocondrial I (NARAYAN et al., 2017); a rotenona é um dos pesticidas que compreendem esses mecanismos de toxicidade, sendo utilizada como agente indutor da DP (ALGHAMDI et al., 2023).

Devido sua lipofilicidade, a rotenona atravessa livremente a barreira hematoencefálica e membranas celulares, acometendo diversas organelas como a mitocôndria, por exemplo (BETARBET et al., 2000; AZIMULLAH et al., 2023). A rotenona possui mecanismo de ação similar ao MPTP, que ocorre através da inibição do complexo mitocondrial I, redução da produção de ATP, geração de espécies reativas de oxigênio e liberação de moléculas pró-apoptóticas que impulsionam a apoptose ao desencadear a ação das caspases (SINHA et al., 2016). Ainda, possui a capacidade de inibir a formação de microtúbulos, o que pode configurar um fator crucial no mecanismo de neurodegeneração dopaminérgica, uma vez que o excesso de monômeros de tubulina dentro da célula pode ser bastante tóxico (RIBEIRO et al., 2012).

Em suma, a exposição à rotenona pode mimetizar características clínicas e patológicas da DP através da sua toxicidade expressa primariamente pela inibição do complexo mitocondrial I e inferências relacionadas, resultando na reprodução de alterações comportamentais, anatômicas, neuroquímicas e neuropatológicas pertinentes à DP. Isso pode ser visto no estudo de Betarbet et al. (2000), uma das primeiras pesquisas em que a rotenona foi utilizada como agente indutor da DP. Nesse estudo, ratos expostos à rotenona de forma crônica, contínua e sistêmica nas concentrações de 2-3 mg/kg ao dia durante 5 semanas apresentaram neurodegeneração dopaminérgica altamente seletiva, sendo estas alterações associadas comportamentalmente à hipocinesia e rigidez; alguns dos sintomas da DP. Além disso, a rotenona mostrou-se capaz de ocasionar a acumulação de inclusões citoplasmáticas fibrilares semelhantes aos corpúsculos de Lewy nos neurônios da substância negra; característica patológica importante da DP não observada em outros modelos de indução pela administração de neurotoxinas.

Embora os roedores sejam as espécies mais usadas para simular distúrbios neurodegenerativos no contexto atual, o *zebrafish* surge como um relevante modelo animal para explorar mecanismos moleculares e fisiológicos de neurodegeneração, e alguns dos fatores para este feito são o rápido desenvolvimento neurológico e alto potencial farmacológico (BASHIRZADE et al., 2022). Sobre este último, vale salientar que a administração de fármacos no *zebrafish* é facilitada por meio aquoso, com isso, a eficácia, biodisponibilidade e toxicidade do fármaco podem ser determinadas de imediato (VAZ et al., 2018). Adicionalmente, a rotenona mostra-se altamente tóxica para peixes, e isso pode ser justificado pela grande área de superfície sobre a qual a rotenona é absorvida; as brânquias (INNOS; HICKEY, 2021).

Diante do exposto, estudos têm sido realizados com a utilização do *zebrafish* exposto à rotenona para induzir as condições neuroquímicas e comportamentais associadas a DP. Por exemplo, adultos de *zebrafish* foram expostos à rotenona numa concentração final de 3 µg/L por 4 semanas consecutivas. Os dados obtidos demonstraram que houve diminuição significativa da liberação e captação do neurotransmissor dopamina, este possui um papel fundamental na DP. Ainda, foi observada a redução da aceleração e distância percorrida pelos peixes, além de comprometimento cognitivo, um sintoma comum entre os pacientes com DP (HETTIARACHCHI et al., 2022). Num outro estudo com *zebrafish* adultos, sendo estes expostos à concentração de 5 µg/L durante 28 dias, também se observou a redução significativa dos níveis de dopamina acompanhada de déficits locomotores. Além disso, verificou-se o aumento da expressão de α -sinucleína, apoptose de neurônios dopaminérgicos,

além da redução do fator neurotrófico, que possui papel fundamental na neuroproteção (KHOTIMAH et al., 2015).

Num estudo realizado por Kalyn et al. (2019), larvas de *zebrafish* foram expostas à rotenona a partir de 3 dpf, e observou-se perda dopaminérgica significativa no diencéfalo ventral das larvas, sendo esta a área escolhida para análise de perda dopaminérgica por ser funcionalmente homóloga à via nigroestriatal em mamíferos. Além disso, houve a verificação de possíveis alterações locomotoras decorrentes da depleção dopaminérgica, e constatou-se uma redução de 46% na distância total percorrida pelas larvas durante a análise da atividade de natação.

Ainda, a rotenona tem se destacado nos últimos anos por desenvolver o modelo experimental de forma progressiva permitindo aprofundar os conhecimentos dos sintomas não motores da DP (HETTIARACHCHI et al., 2022). Por exemplo, além de sintomas motores, Wang et al. (2017) mensuraram sintomas não motores da DP em *zebrafish* adultos expostos à uma concentração de 2 µg/L durante 4 semanas. Dentre outros sintomas não motores observados, verificou-se a presença de sintomas análogos à ansiedade e depressão, além de disfunção olfativa, sendo estes resultados associados a redução dos níveis de dopamina.

Ainda, dada a alta toxicidade da rotenona para peixes, há a possibilidade da realização de testes de embriotoxicidade por meio da exposição de embriões de *zebrafish* à rotenona para estipular concentrações letais. Num estudo realizado por Melo et al. (2015) a concentração de 12,2 µg/L foi determinada como a LC₅₀, sendo esta capaz de causar a mortalidade significativa dos embriões. Ademais, a exposição à rotenona mostrou-se capaz de afetar o desenvolvimento dos embriões, que apresentaram edema cardíaco, deformidade na cauda, atraso na formação de somitos e absorção de saco vitelínico, além da falta de pigmentação.

2.4 OUTRAS NEUROTOXINAS UTILIZADAS PARA INDUÇÃO DE SINTOMAS DP-like

Como suprarrelatado, existe uma relação entre a exposição a pesticidas e outros agentes químicos e a manifestação da DP (CABREIRA; MASSANO, 2019; DE OLIVEIRA et al., 2020). Assim, alguns sistemas modelo de indução à DP-like foram desenvolvidos, e dentre esses sistemas, há os que induzem quimicamente os fenótipos parkinsonianos (ZENG et al., 2018). Alguns compostos químicos são capazes de reproduzir as condições patológicas da DP como: perda dopaminérgica, estresse oxidativo, inflamação, apoptose e, em alguns cenários, a agregação de α -sinucleína e formação de estruturas similares aos corpúsculos de Lewy (BRÍÑEZ-GALLEGO et al., 2023). Dentre os compostos químicos mais utilizados para indução à DP-like além da rotenona é possível citar: o MPTP e o 6-OHDA (análogos da

dopamina) além do herbicida paraquat (RAZALI et al., 2021; THIRUGNANAM; SANTHAKUMAR, 2022).

O potencial do MPTP como agente indutor da DP foi descoberto quando jovens desenvolveram quadros de parkinsonismo ao fazerem uso do que denominavam “heroína sintética”, que ao atravessar a barreira hematoencefálica era rapidamente convertida em uma forma tóxica, sendo esta responsável pelos efeitos parkinsonogênicos (SAMPAIO; CALDAS, 1988; LANGSTON et al., 2017). Adicionalmente, o MPTP consiste em um composto lipofílico, que assim como a rotenona, é capaz de atravessar livremente a barreira hematoencefálica, e ao cruzá-la, é convertido pela monoamina oxidase B nas células gliais em íon 1-metil-4-fenil-2,3-di-hidropiridínio (MPDP⁺), e posteriormente, em sua forma tóxica íon 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺) (HARE et al., 2013).

O efeito tóxico do MPTP consiste precipuamente na inibição do complexo mitocondrial I, que leva à perda de ATP, disfunção mitocondrial e produção de radicais livres causando a morte dos neurônios dopaminérgicos que capturaram seletivamente o MPP⁺ do espaço entre as células via transportador de dopamina, uma vez que o MPP⁺ compartilha semelhança com o neurotransmissor (HARE et al., 2013; KALYN; EKKER, 2021; RAZALI et al., 2022). Ainda vale ressaltar que o transportador de dopamina se trata de uma proteína de membrana responsável por manter os níveis de dopamina pela captação extracelular, sendo esta envolvida diretamente na etiologia de transtornos neuropsiquiátricos como a DP (HETIARACHCHI et al., 2022).

Adicionalmente, por ser um dos compostos capazes de causar neurodegeneração dopaminérgica e outras características patológicas da DP, o MPTP tem sido amplamente empregado para mimetizar a doença em diversos modelos animais, inclusive no *zebrafish* (RAZALI et al., 2021). Por exemplo, em larvas de *zebrafish* expostas ao MPTP a partir de 3 dpf numa concentração de 0,25 mM foi verificada a perda de neurônios dopaminérgicos no diencéfalo ventral das larvas, que coincidiu com uma redução substancial na distância total percorrida e velocidade média das larvas durante a atividade de natação, e isso pode ser justificado pelo fato da disfunção motora está tradicionalmente relacionada à dopamina (KALYN et al., 2019).

A exposição ao MPTP também é capaz de ocasionar déficit olfatório no *zebrafish*, sendo este um dos sintomas não motores da DP. Isso pode ser visto no estudo de Kalyn e Ekker (2021), onde adultos de *zebrafish* expostos ao MPTP por via intraperitoneal numa concentração de 25 mM apresentaram reduções substanciais nos neurônios dopaminérgicos do telencéfalo e dos bulbos olfatórios, que se traduziu em um fenótipo locomotor e olfativo

transitório (KALYN; EKKER, 2021). Ainda, embriões de *zebrafish* expostos ao MPTP por imersão 24 hpf em uma concentração de 800 μM apresentaram redução no número de células que expressam o transportador de dopamina após 24 horas de exposição (LAM et al., 2005).

O 6-OHDA é outra neurotoxina que proporciona modelos animais úteis por meio da degeneração neuronal dopaminérgica na substância negra compacta (MUTHUSAMY et al., 2023), e tem sido utilizada há tempos para induzir neurodegeneração dopaminérgica em modelos animais, já que boa parte destes apresenta sensibilidade ao 6-OHDA (GOMES et al., 2023). Adicionado a isto, seu suposto mecanismo de neurotoxicidade está descrito essencialmente correlacionado à sua captação pelo transportador de dopamina (por ser um análogo da dopamina) e à produção de radicais livres, além da inibição direta do complexo I e IV da cadeia respiratória mitocondrial (GOMES et al., 2023).

Sabe-se que o 6-OHDA não simula perfeitamente a patologia da DP, já que não proporciona a formação de corpúsculos de Lewy, mas, apesar disso, ocasiona a manifestação de outras características patológicas da DP como a perda neuronal dopaminérgica, modificações no complexo mitocondrial I (como mencionado anteriormente) além das alterações comportamentais semelhantes aos sintomas da DP (BRIÑEZ-GALLEGO et al., 2023).

Distintivamente de outros modelos de indução, a neurotoxina 6-OHDA não possui a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo assim, a forma de administração utilizada para exposição é mais invasiva que a sistêmica, ocorrendo por meio da injeção intracerebral (IBARRA-GUTIÉRREZ et al., 2023). Mas, em contrapartida, a exposição de embriões e larvas de *zebrafish* ocorre por imersão, uma vez que a barreira hematoencefálica é formada 72 hpf, assim, as lesões neuronais são possíveis antes desse tempo (THIRUGNANAM; SANTHAKUMAR, 2022). Por exemplo, no estudo de Cronin e Grealy (2017) larvas de *zebrafish* em 48 hpf foram expostas à concentração de 250 μM de 6-OHDA durante 3 dias, onde foi observada a redução na atividade locomotora e perda de neurônios dopaminérgicos em todos os grupos dopaminérgicos do cérebro. Além disso, em outro estudo com larvas expostas ao 6-OHDA, verificou-se a redução significativa de biomarcadores responsáveis pela supressão da formação de radicais livres, indicando reação oxidativa dentro das células. Ainda, foi observada a presença de radicais livres nas células induzidas por 6-OHDA; o estresse oxidativo possui um papel crucial na progressão da DP (KESH et al., 2021).

Diferentemente de embriões e larvas, o *zebrafish* adulto é exposto à 6-OHDA para indução à DP-like por meio de injeção intracerebral, uma vez que no adulto a barreira

hematoencefálica está completamente formada. Num estudo realizado por Vijayanathan et al. (2017), adultos de *zebrafish* foram expostos à 6-OHDA por meio de injeção no cérebro com uma concentração de 25 mg/kg de 6-OHDA, onde foi observada a presença de lesões nos neurônios dopaminérgicos do diencéfalo ventral e conseqüentemente, alterações significativas na atividade locomotora como: a redução na velocidade e distância percorrida pelos peixes lesionados. Ainda, nesse estudo, optaram pela 6-OHDA como neurotoxina para mimetizar características da DP com o intuito de garantir uma lesão limitada ao cérebro, anulando a possibilidade de vazamento da neurotoxina para o sistema nervoso periférico, evitando assim supostos efeitos secundários (VIJAYANATHAN et al., 2017).

O paraquat (N-dimetil-4,4-bipiridina-dicloreto) é um herbicida pertencente à classe bupiridil, e trata-se de mais uma toxina envolvida na manifestação da DP, já que é estruturalmente similar ao MPP+, conseqüentemente, também é reconhecido pelo transportador de dopamina (BRIÑEZ-GALLEGRO et al., 2023). Sua capacidade de ocasionar características patológicas da DP foi descoberta quando uma autópsia de um trabalhador rural exposto ao paraquat exibiu alterações degenerativas nas células da substância negra (DORSEY; RAY, 2023).

Assim como as outras neurotoxinas, a toxicidade do paraquat tem sido relacionada à inibição do complexo mitocondrial I, causando alterações na cadeia transportadora de elétrons, e conseqüentemente, a produção exacerbada de radicais livres (DOYLE; CROLL, 2022). Ainda, a superprodução dessas espécies reativas pode culminar no aumento da lipoperoxidação, além de fundamentar parcialmente a agregação de α -sinucleína nos neurônios dopaminérgicos, resultando em morte neuronal dopaminérgica, uma vez que a agregação dessas proteínas malformadas pode acionar respostas autoimunes (VACCARI et al., 2019).

Em modelos animais, a administração sistêmica de paraquat pode induzir sintomas semelhantes à DP (VACCARI et al., 2019). Por exemplo, a exposição de larvas de *zebrafish* ao paraquat a partir de 3 dpf a uma concentração de 1 mM foi usada para causar fenótipos semelhantes à DP. Verificou-se uma redução de 18% nos neurônios dopaminérgicos diencefálicos ventrais, além da diminuição de 41% da tirosina hidroxilase (enzima envolvida na síntese de dopamina) e 37% transportador de dopamina, porém não foi observado efeito significativo na locomoção (KALYN et al., 2019). No estudo de Nunes et al. (2017), *zebrafish* adultos expostos a concentração de 20 mg/kg de paraquat administrado por via intraperitoneal induziu lesões cerebrais, alterações no sistema de defesa antioxidante, diminuição da

viabilidade mitocondrial além de comportamentos do tipo ansiedade, um sintoma não motor da DP.

Diante do exposto, é possível inferir que a exposição às neurotoxinas é capaz de reproduzir diversos atributos da DP, entretanto, os mecanismos utilizados para alcançar fenótipos semelhantes não representam necessariamente todas as características da doença com precisão (DOYLE; CROLL, 2022). Embora não exista um modelo que reproduza todas as características clínicas e patológicas da DP, modelos animais farmacológicos existentes cooperam fortemente para a compreensão da fisiopatologia da doença e investigação de possíveis alternativas terapêuticas (THIRUGNANAM; SANTHAKUMAR, 2022).

2.5 AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DO *ZEBRAFISH* (*Danio rerio*) COMO MODELO PARA A DP

Estudos anteriores descreviam o comportamento dos peixes como simples e estereotipados (ROSE, 2002; ROSE, 2007), no entanto, estudos mais recentes constataram respostas comportamentais complexas e dependentes do contexto em que o *zebrafish* se encontra (ABREU et al., 2016; GIACOMINI et al., 2016). Por exemplo, quando exposto a estímulos (mecânicos ou químicos), o *zebrafish* tende a apresentar respostas comportamentais mensuráveis bem estabelecidas (KALUEFF et al., 2014b), sendo estas evolutivamente conservadas e semelhantes aos comportamentos das espécies de mamíferos (KALUEFF et al., 2014a).

Ainda, os fenótipos comportamentais do *zebrafish* podem proporcionar informações relevantes sobre função cerebral normal e patológica durante a modelagem de doenças humanas (KALUEFF et al., 2013). Neste contexto, alguns testes realizados com o *zebrafish* podem ser ferramentas importantes para criar modelos válidos para o estudo de distúrbios que refletem no comportamento (KALYN et al., 2019; CADENA et al., 2020a), como por exemplo, a DP. Ademais, alterações nos padrões de comportamento são indicadores elementares do estabelecimento do modelo e da eficácia dos agentes terapêuticos propostos para o tratamento da condição patológica (WANG et al., 2021). Ainda, mudanças no comportamento normal do *zebrafish* exposto a substâncias indutoras de sintomas DP-like podem fornecer informações sobre o mecanismo de ação dessas substâncias, indicar falhas na neurotransmissão e outros mecanismos neurais, sugerir modificações na sinalização intracelular entre outros (BRIÑEZ-GALLEGO et al., 2023).

Adicionalmente, dentre os testes realizados no contexto de modelagem da DP é possível citar: atividade locomotora, sensibilidade ao toque, tigmotaxia e teste de preferência

claro/escuro (LAM et al., 2005; WANG et al., 2017; ANDRADE et al., 2022). O teste de atividade locomotora consiste em quantificar a ação natatória espontânea do *zebrafish*; e para esse teste, vídeos com duração definida são gravados e analisados por um software específico. Este gera de forma automática linhas que representam a trajetória realizada pelo peixe durante a gravação. Ainda, a partir desse teste, é possível obter dados como: distância total percorrida (cm), velocidade média (cm/s) e tempo parado (s). Diante disso, é possível verificar se a substância administrada para indução de sintomas DP-like no *zebrafish* ocasionou disfunções motoras, características pertinentes ao quadro clínico da DP (ANDRADE et al., 2022).

No teste de sensibilidade ao toque, os animais são submetidos a estímulos mecânicos, sendo estes realizados na região da cabeça ou da cauda com o auxílio de objetos pontiagudos. Os estímulos são executados com o intuito de ativarem os reflexos sensório-motores das larvas de *zebrafish*, e conseqüentemente, ocasionar a manifestação do comportamento de fuga como resposta ao estímulo que se apresenta como o aumento repentino da velocidade e movimento ou natação errática. Ademais, a resposta de fuga fornece informações sobre o estado funcional dos neurônios motores das larvas de *zebrafish*. As larvas afetadas apresentam respostas táteis fracas e breves, ou até mesmo não exibem nenhum tipo de resposta, o que pode indicar que a substância utilizada para causar sintomas semelhantes à DP pode ter comprometido a sensibilidade ou a capacidade locomotora das larvas (LAM et al., 2005; WANG et al., 2021; ANDRADE et al., 2023).

Quanto ao teste de tigmotaxia, este é utilizado para avaliar um comportamento análogo à ansiedade, um dos sintomas não motores da DP (ANDRADE et al., 2023). Adicionalmente, a tigmotaxia é caracterizada pela tendência do indivíduo em evitar o centro de um ambiente novo, possuindo preferência pelos limites deste. Ainda, é exibido por uma ampla gama de espécies e tem sido comumente empregado como parâmetro comportamental em estudos pré-clínicos por ser um índice validado de ansiedade (SCHNÖRR 2012; WANG et al., 2023). No contexto de modelagem da DP utilizando larvas de *zebrafish* como modelo animal, a tigmotaxia é considerada afetada quando os animais se mantêm no centro de um ambiente novo ainda nos instantes iniciais de condicionamento (ANDRADE et al., 2023).

O teste de preferência claro/escuro também é utilizado para avaliar um comportamento semelhante à ansiedade utilizando o *zebrafish* como modelo animal para a DP. Para esse teste, *zebrafish* adultos sob administração de rotenona foram alocados em tanques, sendo estes separados em compartimentos escuros e claros. Os peixes foram colocados no compartimento claro e deixados para nadar espontaneamente durante 6 minutos, sendo este também o período em que houve o registro da atividade dos peixes mediante gravação de vídeo. A latência para

entrar no compartimento escuro, o tempo gasto no compartimento claro e o número de cruzamentos entre compartimentos foram calculados utilizando um software. O aumento do tempo no compartimento claro e uma latência mais longa para entrar no compartimento escuro sugeriram um comportamento semelhante à ansiedade e depressão induzido pela rotenona no *zebrafish* adulto (WANG et al., 2017), sendo estes sintomas não motores apresentados por indivíduos acometidos pela DP (RAY; AGARWAL, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar parâmetros comportamentais relacionados à ansiedade, sensibilidade tátil, percepção visual e locomoção de larvas de *zebrafish* sob a administração do pesticida rotenona para indução à DP-like.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir a DP-like em larvas de *zebrafish* utilizando a rotenona como modelo experimental;
- Avaliar os parâmetros comportamentais nos animais afetados através dos testes de Tigmotaxia, Sensibilidade ao Toque e Bolas Saltitantes.

4 METODOLOGIA

4.1 MANUTENÇÃO DO ZEBRAFISH (*Danio rerio*) E COLETA DOS EMBRIÕES

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal (LECA), biotério cadastrado na plataforma do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CIUCA-CONCEA), pertencente ao Departamento de Morfologia e Comportamento Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Todos os protocolos utilizados no presente estudo foram previamente autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais - (CEUA/UFRPE), licença nº 3581030221.

Os espécimes adultos de *zebrafish* (*Danio rerio*, linhagem selvagem) utilizados nos experimentos foram originários de plantel do próprio do biotério, sendo acondicionados em aquários com capacidade de 80 litros, sistema de filtragem, temperatura da água mantida em 26 ± 1 °C, pH em $7,0 \pm 0,5$ e fotoperíodo 14/10 h (claro/escuro), condições ideais para a manutenção do bem-estar dos animais (OLIVEIRA et al., 2023). Adicionalmente, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia, havendo alternância da dieta entre ração comercial extrusada e artêmia salina.

O processo de obtenção dos ovos baseou-se no protocolo da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE 236, 2013), onde os animais adultos foram separados para reprodução de acordo com o sexo em aquários de policarbonato (Figura 3) (Zebclean, Alesco) com fêmeas e machos numa proporção de 2:4 respectivamente.

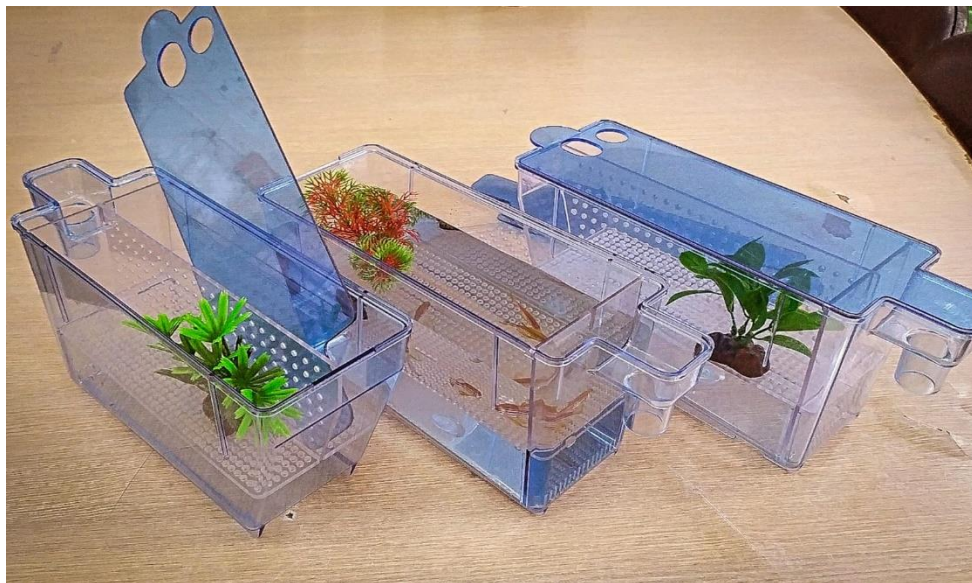


Figura 3. Aquários confeccionados em policarbonato utilizados para reprodução do *zebrafish* (Zebclean, Alesco). **Fonte:** Própria.

Após a desova, os ovos viáveis (fertilizados e não-coagulados) foram coletados e separados aleatoriamente, sendo acondicionados em potes estéreis (15 ovos por pote) de poliestireno (capacidade de 80 mL) com água estéril e declorada para a formação de 7 grupos experimentais (7 grupos x 15 animais por pote x 8 repetições = 840 animais). Os grupos formados foram mantidos em incubadora somente na água estéril e declorada até 72 hpf. A temperatura da água foi preservada em 26 ± 1 °C, pH $7,0 \pm 0,5$ e fotoperíodo 14/10 h (claro/escuro) (OLIVEIRA et al., 2023).

4.2 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE ROTENONA, EXPOSIÇÃO E SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS

Preparou-se uma solução aquosa 0,02 mg/mL de rotenona (ROT R8875, SIGMA, St. Louis MO, EUA) em 0,1% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO). Esta solução concentrada foi usada para diluição em 80 mL de água nos potes de poliestireno. Foram obtidas concentrações nominais finais de 5 (RT 5), 10 (RT 10), 11 (RT 11), 11,25 (RT 11,25), 12 (RT 12) e 15 $\mu\text{g/L}$ (RT 15), onde as larvas, a partir de 72 hpf foram expostas à rotenona formando os respectivos grupos. O grupo controle foi exposto apenas a 0,1% (v/v) de DMSO (designado grupo

DMSO). A exposição das larvas ocorreu a partir de 72 hpf até 144 hpf com renovação diária das soluções, bem como a verificação da sobrevivência dos animais (OCDE 236, 2013).

4.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

Em 144 hpf, as larvas visivelmente saudáveis (sem a presença de defeitos morfológicos) (CADENA et al., 2020a) foram transferidas dos potes de poliestireno para placas de 48 poços (uma larva por poço) para serem submetidas aos ensaios comportamentais; realizados entre 10:00 - 12:00 h para evitar influências sob a atividade locomotora e sensibilidade visual dos animais (SOUZA et al., 2023). Antes de cada teste, as larvas foram aclimatadas para evitar alterações comportamentais provenientes do manejo e transporte (MACPHAIL et al., 2009). O teste de Tigmotaxia foi o primeiro teste realizado, sendo categórico na identificação de comportamentos preditivos de ansiedade (BASNET et al., 2019). As placas contendo as larvas foram dispostas horizontalmente sobre um monitor (LCD, Dell E2211H), e a resposta foi registrada para avaliar a preferência delas pelas bordas dos poços. O registro da resposta ocorreu mediante fotografia; capturada por uma câmera (Canon EOS 6D DSLR; lente: Canon EF 75-300 mm f/4-5.6) com vista superior e uma distância de 150 cm das placas dispostas sobre o monitor, enquanto este exibia fundo branco. Para este teste, foi obtida resposta dicotômica, para cada animal: sim (para larvas próximas à borda) e não (para larvas afastadas da borda). Do mesmo modo, houve obtenção de resposta dicotômica para o teste Sensibilidade ao Toque, sendo realizado após o teste de Tigmotaxia para avaliar a resposta larval aos estímulos mecânicos feitos na região da cabeça ou da cauda. A resposta registrada foi: sim (para larvas que demonstraram comportamento de fuga) e não (para larvas que não demonstraram comportamento de fuga). Por último, realizou-se o teste das Bolas Saltitantes usado para avaliar respostas pertinentes à interação espacial, coesão social, capacidade cognitiva e fuga das larvas a estímulos visuais (PELKOWSKI et al. 2011; NERY et al. 2014; BRIDI et al. 2017). As larvas foram transferidas para placas de 6 poços, cada poço comportando $\frac{1}{3}$ de cada grupo experimental. As placas foram dispostas sobre o monitor, e após 1,53 minutos de aclimação em tela escura, foi exibida uma animação com estímulos visuais criada no Microsoft Power Point (Office 365). A animação continha bolas vermelhas (diâmetro 1,35 cm) que se moviam da esquerda para a direita numa reta com trajetória de 2 cm na área de estímulo (metade inferior do poço) durante 5 minutos. O quantitativo de larvas no mesmo quadrante do poço forneceu dados referentes ao nível de agrupamento e coesão social entre elas. Para coleta dos dados foi realizada uma análise a cada 30 s (NERY et al. 2014; BRIDI et al. 2017).

4.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados dos testes de Tigmotaxia, Sensibilidade ao Toque e os dados referentes a sobrevivência dos animais foram analisados por *oneway* ANOVA. Quando a diferença foi significativa, as médias foram comparadas por meio do teste de Tukey com $p < 0,05$. Para os dados referentes as Bolas Saltitantes, foi usado o teste de simetria de MCNemar. Para as análises estatísticas utilizou-se o software Origin Pro Academic 2015 (Origin Lab. Northampton, MA, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes a sobrevivência dos animais são apresentados na figura 4. A partir da figura 4, observa-se que o percentual de sobrevivência das larvas de *zebrafish* foi significativamente reduzido nos grupos expostos às concentrações de 12 e 15 $\mu\text{g/L}$ de rotenona.

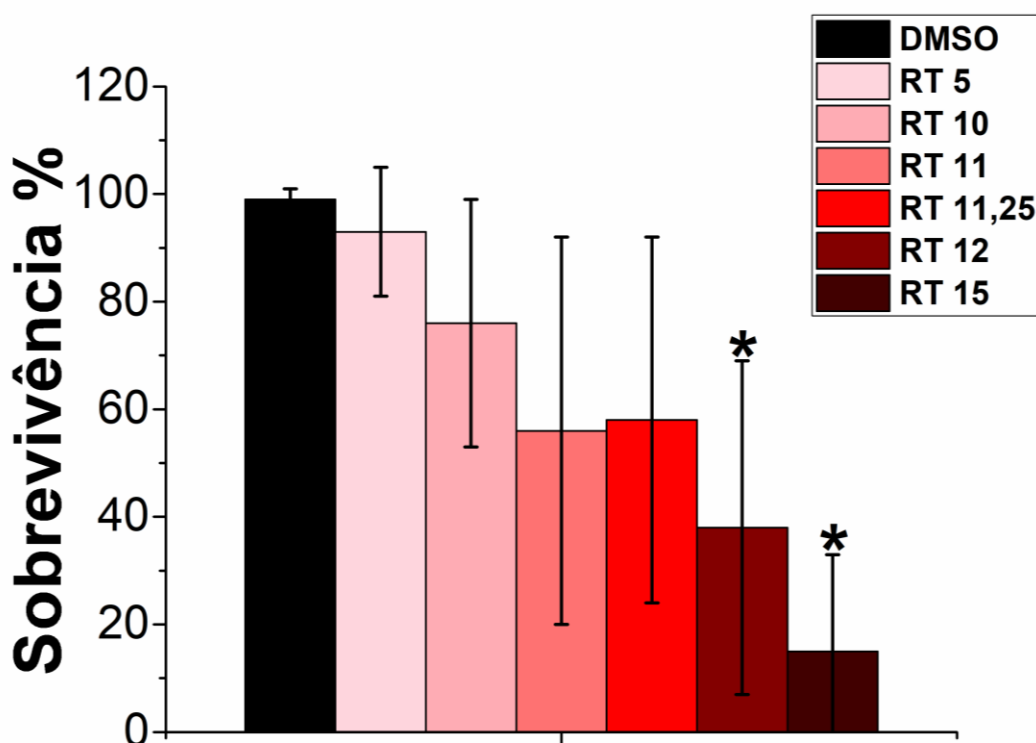


Figura 4: O percentual de sobrevivência das larvas de *zebrafish* foi significativamente reduzido ($p < 0,05$) nos grupos expostos às concentrações de 12 e 15 $\mu\text{g/L}$ de rotenona.

Andrade et al. (2023) observaram alta taxa de mortalidade no modelo de toxicidade embriolarval de *zebrafish* nas maiores concentrações utilizadas (15 e 20 $\mu\text{g/L}$). Segundo os mesmos autores, a execução de testes com animais expostos a essas concentrações mais altas

podem ser dificultadas pela redução significativa na sobrevivência destes. Ainda vale ressaltar que no modelo embriolarval utilizado por Andrade et al. (2023) houve maior mortalidade do que no modelo larval utilizado em nosso estudo, o que torna este último mais adequado para o estudo da DP, onde há o enfoque nos parâmetros neurocomportamentais.

Os resultados do teste de tigmotaxia, utilizado para avaliar comportamentos análogos à ansiedade, são apresentados na figura 5. A partir dos dados contidos na figura 5, observa-se que a rotenona afetou a tigmotaxia nos grupos com concentrações maiores e iguais a 11 µg/L. Ainda, neste teste, observou-se que aproximadamente 90% das larvas do grupo DMSO mantiveram-se próximas às bordas dos poços, sendo este o comportamento esperado para o referido grupo.

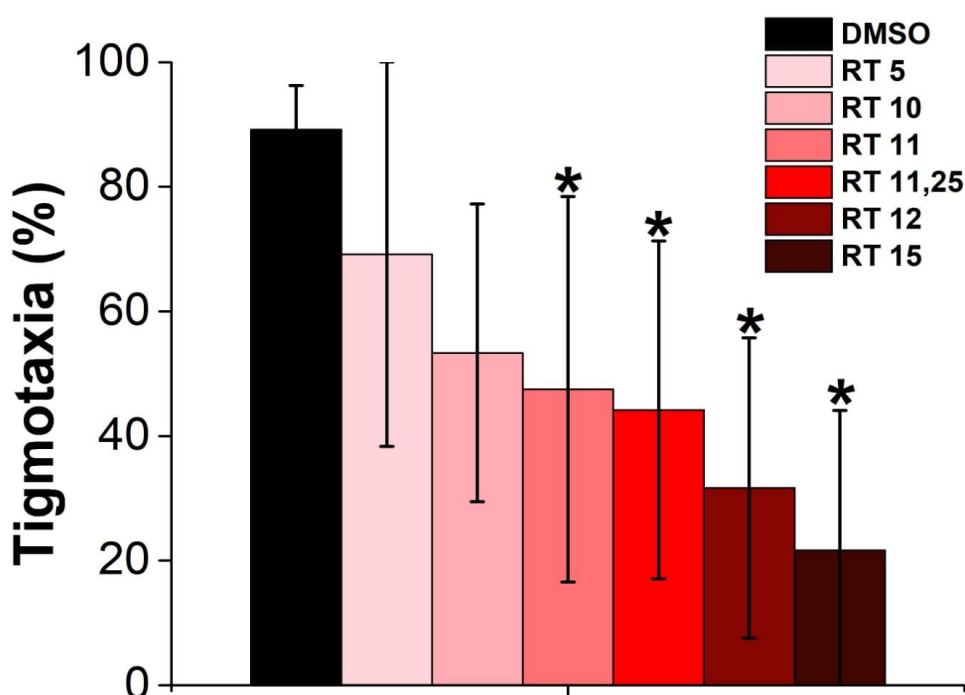


Figura 5: A tigmotaxia foi significativamente afetada ($p < 0,05$) em larvas de *zebrafish* expostas às concentrações maiores e iguais a 11 µg/L de rotenona.

Andrade et al. (2023) também utilizaram o teste de tigmotaxia para avaliar comportamentos análogos à ansiedade em modelo embriolarval de *zebrafish* exposto à rotenona. A exposição dos embriões de *zebrafish* foi feita a partir de 2 hpf às concentrações de 5, 10, 15 e 20 µg/L. Ainda, no referido estudo, foram observadas mudanças na tigmotaxia das larvas nas maiores concentrações utilizadas (15 e 20 µg/L). Os mesmos autores concluíram que as alterações na tigmotaxia podem indicar que a rotenona é capaz de alterar a

atividade neuronal, causando mudanças no comportamento semelhante à ansiedade, o que fundamenta os nossos achados. Os estudos que investigaram comportamentos do tipo ansiedade em larvas de *zebrafish* expostas às neurotoxinas para indução à DP-like ainda são escassos. No entanto, existem alguns outros estudos que avaliaram este tipo de comportamento em peixes adultos. Por exemplo, Wang et al. (2017) avaliaram um comportamento semelhante à ansiedade em *zebrafish* adultos como modelo DP-like expostos à rotenona. Este comportamento foi avaliado por meio do teste de preferência claro/escuro. Nesse mesmo estudo, uma concentração de 2 µg/L foi capaz de afetar o comportamento dos animais. De acordo com os mesmos autores, estes achados foram relacionados principalmente com a depleção de dopamina no cérebro ocasionada pela ação da rotenona, já que esta é capaz de inibir o complexo mitocondrial I dos neurônios dopaminérgicos, ocasionando a morte destes. Adicionalmente, assim como os peixes adultos, as larvas de *zebrafish* possuem sistema dopaminérgico — nas larvas de *zebrafish*, as projeções dopaminérgicas estão completamente formadas entre 3 e 4 dpf (DU et al., 2016; KALYN et al., 2019). Diante disso, assim como foi visto no estudo utilizando peixes adultos, sugere-se que a rotenona tenha atuado de forma semelhante em nosso estudo causando perda dopaminérgica, e conseqüentemente, as alterações no comportamento análogo à ansiedade das larvas utilizadas no nosso estudo. No teste de sensibilidade ao toque, utilizado para verificar a capacidade de resposta a estímulos mecânicos, observou-se reduções significativas na exibição de comportamento de fuga como resposta ao toque (Figura 6) nos grupos com as 4 maiores concentrações (RT 11, RT 11,25, RT 12, RT 15).

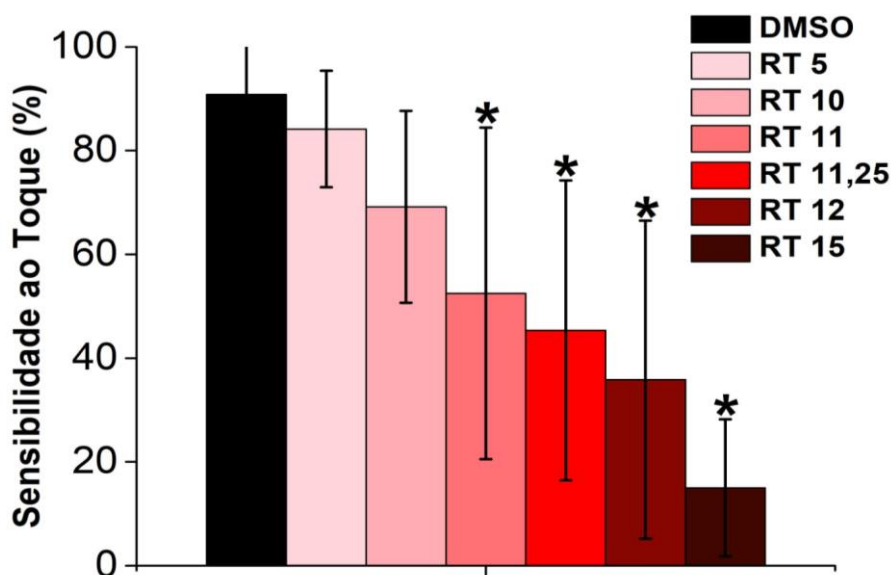


Figura 6: Larvas de *zebrafish* apresentaram reduções significativas ($p < 0,05$) na exibição de comportamento de fuga em resposta ao toque quando expostas às concentrações maiores e iguais a 11 µg/L.

Andrade et al. (2023) também utilizaram *zebrafish* exposto à rotenona para avaliar respostas a estímulos mecânicos por meio do teste de sensibilidade ao toque em um modelo de toxicidade embriolarval. Como resultado, observaram uma redução significativa no comportamento de fuga como resposta ao toque em larvas expostas à maior concentração de rotenona (20 µg/L). Ademais, os autores explicaram que a diminuição da sensibilidade pode estar associada à ação neurotóxica da rotenona. Ainda, num estudo realizado por Lam et al. (2005), a neurotoxina MPTP foi administrada para induzir neurodegeneração em embriões de *zebrafish* 24 hpf, quando os neurônios dopaminérgicos são detectados pela primeira vez no diencéfalo, e foi utilizado um teste semelhante ao nosso para verificar respostas a estímulos táteis em 72 hpf. Os mesmos autores observaram que as larvas do grupo controle apresentaram fortes reflexos por meio da movimentação do tronco, enquanto as larvas tratadas com MPTP produziram respostas táteis fracas e breves. Ou seja, a exposição à neurotoxina MPTP ocasionou déficits na resposta de natação das larvas. Este resultado fornece espaço para a seguinte questão: além da diminuição sensorial, a incapacidade ou dificuldade das larvas de responderem ao teste de sensibilidade ao toque pode estar relacionada a defeitos na locomoção gerados pela neurotoxina utilizada para indução de sintomas *DP-like*. A rotenona por também induzir neurodegeneração dopaminérgica, e conseqüentemente, a redução dos níveis de dopamina, pode ter afetado a capacidade das larvas de apresentar respostas motoras quando submetidas ao teste de sensibilidade ao toque, da mesma forma que foi observado em modelo *DP-like* exposto a MPTP. Isso pode ser justificado pelo fato de que, além de outros aspectos, o neurotransmissor dopamina está intrinsecamente relacionado ao controle motor (ISAACSON et al., 2023), e a produção da dopamina de forma insuficiente resulta em déficits locomotores, o que também pode ter ocorrido com as larvas do nosso estudo. Portanto, os resultados encontrados em nosso trabalho confirmaram que a rotenona pode afetar a capacidade de resposta ao teste de sensibilidade ao toque dos animais.

Os resultados do teste de bolas saltitantes são apresentados na figura 7. A partir da figura 7, é possível observar que a rotenona afetou a capacidade de resposta de agrupamento das larvas em concentrações maiores e iguais a 11 µg/L.

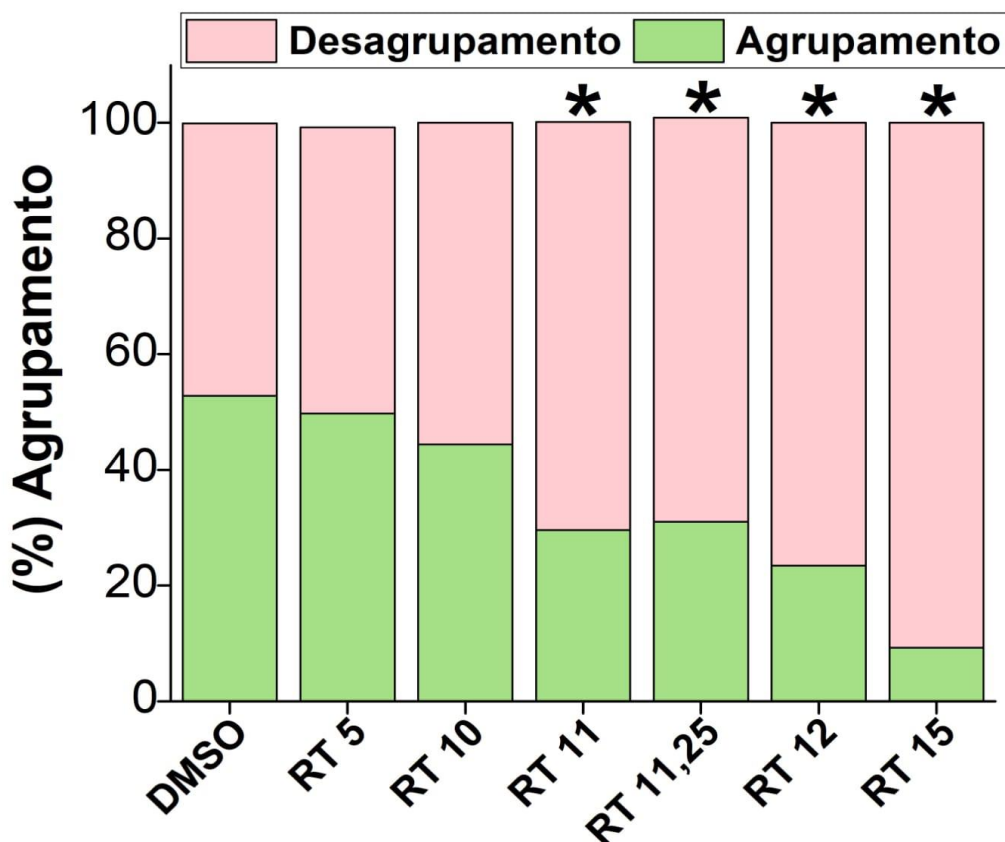


Figura 7: Larvas de *zebrafish* apresentaram reduções significativas ($p < 0,05$) na resposta de agrupamento em concentrações maiores e iguais a 11 µg/L.

Pouco se sabe sobre os impactos da rotenona no comportamento social do *zebrafish*. Entretanto, um estudo recente mostrou que a rotenona alterou esse comportamento no peixe adulto (ILIE et al., 2022). Apesar disso, não foram encontrados na literatura estudos avaliando a capacidade de agrupamento como resposta a estímulos aversivos em larvas de *zebrafish* expostas a neurotoxinas utilizadas para indução de sintomas DP-like. Sendo assim, é preciso levar em consideração que o comportamento social integra alguns aspectos, como por exemplo, a capacidade cognitiva — percepção de fatores ambientais e manifestação de respostas de interação espacial e social adequadas por parte das larvas. Além disso, a resposta cognitiva está relacionada com a capacidade visual (perceber o ambiente e o estímulo) e locomotora (movimento de fuga e aproximação entre os coespecíficos) (BAILEY et al., 2015; MESALKINA et al., 2017; GERLAI et al., 2020). Diante disso, a resposta de agrupamento

das larvas de *zebrafish* no nosso teste de bolas saltitantes pode ter sido prejudicada por alterações locomotoras ocasionadas pela ação da rotenona, assim como foi observado no teste de sensibilidade ao toque. No estudo de Kalyn et al. (2019) larvas de *zebrafish*, que assim como no presente estudo, foram expostas a rotenona a partir de 72 hpf (3 dpf), apresentaram defeitos de locomoção que resultaram em uma redução de 46% na distância total percorrida durante a natação. Além disso, houve diminuições acentuadas na expressão gênica de *th1* (tirosina hidroxilase), uma enzima envolvida na síntese de dopamina, além da perda significativa de neurônios dopaminérgicos no diencéfalo ventral das larvas. O que também pode justificar neuroquimicamente os prováveis déficits locomotores encontrados nas larvas dos nossos testes. Ainda, apesar dos mesmos autores terem realizado a exposição de larvas de *zebrafish* em 72 hpf (3 dpf), o tempo de exposição foi até 168 hpf (7 dpf). Além disso, o modelo utilizado foi de linhagem transgênica e a temperatura ambiente a qual os animais estavam submetidos foi de aproximadamente 23 °C. Diante do exposto, não é possível uma comparação direta de resultados devido ao artigo de Kalyn et al. (2019) ser realizado em condições diferentes do nosso. Neste contexto, variações relevantes no comportamento podem ser observadas dependendo da linhagem do *zebrafish* e dos parâmetros ambientais sob os quais os animais estão expostos (SILVA et al., 2023), o que torna o nosso estudo distinto ao estudo de Kalyn et al. (2019).

Ainda, considerando que o teste de bolas saltitantes envolve estímulos visuais e interação entre coespecíficos, é válido considerar que a capacidade de resposta das larvas a este teste também envolve competência visual, ou seja, as larvas devem ser capazes de visualizar os estímulos e umas às outras para responderem positivamente ao teste. Poucos estudos avaliaram a acuidade visual do *zebrafish* exposto à rotenona e outras neurotoxinas utilizadas para induzir *DP-like*. No entanto, Li e Dowling (2000) avaliaram a sensibilidade visual do *zebrafish* adulto exposto a 6-OHDA por injeção intraocular, e concluíram que houve alterações visuais decorrentes primariamente da redução de dopamina na retina dos peixes, uma vez que esta neurotoxina também é capaz de causar neurodegeneração dopaminérgica. Adicionalmente, existem estudos que mostram danos na retina e alterações visuais em ratos e camundongos sob administração da rotenona (BIEHLMAIER et al., 2007; ZHANG et al., 2006; SASAOKA et al., 2020) e MPTP (TATTON et al., 1990). Ainda, há um consenso entre os mesmos autores de que as alterações visuais ou retinianas nos modelos propostos possuem relação com estresse oxidativo e deficiência dopaminérgica. Os mecanismos de ação da rotenona, assim como de outras neurotoxinas, envolvem estresse oxidativo e redução dos níveis de dopamina, e da mesma forma que os modelos utilizados nos referidos estudos, as

larvas de *zebrafish* apresentam neurônios dopaminérgicos na retina, sendo estes já detectados em 72 hpf (HOLZSCHUH et al., 2001). Diante disso, além das prováveis alterações locomotoras já observadas em outro teste do nosso estudo, há a possibilidade de que a incapacidade das larvas de responderem ao teste das Bolas Saltitantes também esteja relacionada a alterações visuais decorrentes da degeneração de neurônios dopaminérgicos da retina das larvas pela ação da rotenona.

Em face do exposto, é possível realizar o seguinte questionamento: “Será que a rotenona afetou a capacidade visual das larvas, e a partir disso, elas apresentaram dificuldade em enxergar os coespecíficos? Ou será que a rotenona afetou a locomoção, e consequentemente, a capacidade das larvas de nadarem até os coespecíficos?”. Estas duas hipóteses precisam ser comprovadas através de futuros experimentos.

Como foi visto ao decorrer do presente estudo, as concentrações de rotenona capazes de causar alterações comportamentais nas larvas de *zebrafish* consistem no intervalo de 11 a 15 µg/L, no entanto, as concentrações de 12 e 15 µg/L reduziram significativamente a sobrevivência dos animais. Diante disso, considerando um maior percentual de sobrevivência e a presença de defeitos significativos em todos os testes, as concentrações mais indicadas para se observar efeitos comportamentais neste modelo foram 11 e 11,25 µg/L.

6 CONCLUSÕES

- Diante do trabalho exposto, podemos concluir que foi possível avaliar parâmetros comportamentais de larvas de *zebrafish* expostas à rotenona, uma vez que o modelo utilizado se mostrou adequado para analisar sintomas *DP-like*;
- Foi possível inferir que o tempo de início e duração de exposição à rotenona, bem como as quatro maiores concentrações utilizadas (11, 11,25, 12 e 15 µg/L) forneceram efeitos comportamentais satisfatórios (no que diz respeito à mimetização de fenótipos parkinsonianos) em todos os testes realizados;
- Levando em consideração um maior percentual de sobrevivência e a presença de defeitos significativos em todos os testes, as concentrações mais indicadas para se observar efeitos comportamentais neste modelo foi 11 e 11,25 µg/L;
- Haja vista que o modelo utilizado se mostrou apropriado, há a possibilidade da aplicação deste para a triagem de compostos que possam contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da doença e melhora da qualidade de vida dos indivíduos acometidos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU M, et al. Behavioral responses of zebrafish depend on the type of threatening chemical cues. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 202, p. 895-901, 2016.

ABREU M, et al. Neuropharmacology, pharmacogenetics and pharmacogenomics of aggression: The zebrafish model. **Pharmacological Research** , V.141, p.602-608, 2019.

ALGHAMDI A. et al. Rosinidin inhibits NF- κ B/ Nrf2/caspase-3 expression and restores neurotransmitter levels in rotenone-activated Parkinson's disease. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 30, n. 6, p.103656, 2023.

AL-HAMALY M, et al. Zebrafish Cancer Avatars: A Translational Platform for Analyzing Tumor Heterogeneity and Predicting Patient Outcomes. **International Journal of Molecular Sciences** , v. 24, n. 3, p.2288, 2023.

ANDRADE A, et al. Efeitos motores da rotenona em zebrafish como modelo animal da doença de Parkinson-like. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v.15, n.6, p.10196-10196, 2022.

ANDRADE, A.L.C. et al. Evaluation of toxicity and non-motor symptoms of Parkinson-like induced by rotenone in zebrafish animal model, 2023

ANGUCHAMY V; MUTHUVEL A. Enhancing the neuroprotective effect of squid outer skin astaxanthin against rotenone-induced neurotoxicity in in-vitro model for Parkinson's disease. **Food and Chemical Toxicology** , v. 178, p.113846, 2023.

AZIMULLAH S, et al. Myrcene Salvages Rotenone-Induced Loss of Dopaminergic Neurons by Inhibiting Oxidative Stress, Inflammation, Apoptosis, and Autophagy. **Molecules** , v. 28, n. 2, p.685, 2023.

BASHIRZADE A, et al. Modeling neurodegenerative disorders in zebrafish. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 138, p.104679, 2022.

BASNET R, et al. Zebrafish Larvae as a Behavioral Model in Neuropharmacology. **Biomedicines** , v.7, n.1, p.23, 2019.

BAILEY, J.M et al. Pharmacological analyses of learning and memory in zebrafish (*Danio rerio*). **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 139, p.103-111, 2015.

BETARBET R, et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature neuroscience**, v.3, n.12, p.1301-1306, 2000.

BIEHLMAIER, O. et al A rat model of Parkinsonism shows depletion of dopamine in the retina. **Neurochemistry international**, v. 50, n. 1, p. 189-195, 2007.

BRIDI D, et al. Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish. **Toxicology**, v.392, p.32-39, 2017.

BRÍÑEZ-GALLEGO, Paola et al. Experimental models of chemically induced Parkinson's disease in zebrafish at the embryonic larval stage: a systematic review. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 26, n. 4, p. 201-237, 2023.

BUCUR, Madalina; PAPAGNO, Costanza. Deep brain stimulation in Parkinson disease: a meta-analysis of the long-term neuropsychological outcomes. **Neuropsychology review**, v. 33, n. 2, p. 307-346, 2023

CABREIRA V; MASSANO J. Parkinson's Disease: Clinical Review and Update. **Acta Med Port**, v. 32, n.10, p.661-670, 2019.

CADENA P, et al. Folic acid reduces the ethanol-induced morphological and behavioral defects in embryonic and larval zebrafish (*Danio rerio*) as a model for fetal alcohol spectrum disorder (FASD). **Reproductive Toxicology**, v.96, p.249-257, 2020.

CANEDO A, et al. Zebrafish (*Danio rerio*) meets bioethics: the 10Rs ethical principles in research. **Brazilian Animal Science**, v.23, p.70884, 2022.

CAO Y, et al. Research Progress on the Construction and Application of a Diabetic Zebrafish Model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n.6, p.5195, 2023.

CHIA S, et al. Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. **international Journal of molecular sciences**, v. 21, n.7, p.2464, 2020.

COOPER J, et al. Modeling Parkinson's Disease in *C. elegans*. **Journal of Parkinson's Disease**, v.8, n.1, p.17-32, 2018.

CORREA, Clynton Lourenço et al. Use of invertebrates to model chemically induced parkinsonism-symptoms. **Biochemical Society Transactions**, v. 51, n. 1, p. 435-445, 2023.

CRONIN A; GREALLY M. Neuroprotective and Neuro-restorative Effects of Minocycline and Rasagiline in a Zebrafish 6-Hydroxydopamine Model of Parkinson's Disease. **Neuroscience**, v.367, p.34-46, 2017.

DAMMSKI A, et al. **Manual de Criação em Biotério**. UFPR, p.107, 2022.

DICKSON D, et al. Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v.46, p.S30-S33, 2018.

DONGJIE S, et al. Neuroprotective effects of Tongtian oral liquid, a Traditional Chinese Medicine in the Parkinson's disease-induced zebrafish model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.148, p.112706, 2022.

DOOLEY K; ZON L. Zebrafish: a model system for the study of human disease. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.10, n.3, p.252-256, 2000.

DORSEY E, et al. The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic. **Journal of Parkinson's disease** , v. 8, n.1, p.S3-S8, 2018.

DORSEY E.; BLOEM B. The Parkinson Pandemic-A Call to Action. **JAMA neurology**, v.75, n.1, p.9-10, 2018.

DORSEY E; RAY A. Paraquat, Parkinson's Disease, and Agnotology. **Movement disorders**, 2023.

DOYLE, Jillian M.; CROLL, Roger P. A Critical review of zebrafish models of Parkinson's disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 835827, 2022.

DRAOUI A, et al. Parkinson's disease: From bench to bedside. **Revue neurologique**, v.176, n.7-8, p.543-559, 2020.

DU Y, et al. Spatial and Temporal Distribution of Dopaminergic Neurons during Development in Zebrafish. **Frontiers in neuroanatomy**, v.10, p.115, 2016.

FUKUSHIMA H, et al. Potenciais usos do modelo animal Zebrafish Danio rerio em pesquisas na Medicina Veterinária. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v.18, n.1, 2020.

GERLAI, Robert. "Evolutionary conservation, translational relevance and cognitive function: The future of zebrafish in behavioral neuroscience." **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 116, p. 426-435, 2020.

GIACOMINI A, et al. As manipulações ambientais e farmacológicas atenuam a resposta ao estresse do peixe-zebra de maneira semelhante. **Relatórios Científicos**, v.6, n.1, p.28986, 2016.

GOMES A, et al. Protective effects of 24-epibrassinolide against the 6-OHDA zebrafish model of Parkinson's disease. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, v.269, p.109630, 2023.

GROW, D. A. et al. Advantages of nonhuman primates as preclinical models for evaluating stem cell-based therapies for Parkinson's disease. **Stem cell research**, v. 17, n. 2, p. 352-366, 2016.

HARE D, et al. Metallobiology of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. **Metalomics**, v.5, n.2, p.91-109, 2013.

HAYES M. Parkinson's Disease and Parkinsonism. **The American Journal of Medicina**, v.132, n.7, p.802-807, 2019.

HEINZ S, et al. Mechanistic Investigations of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone in the Context of Pharmacological and Safety Evaluation. **Scientific reports**, v.7, n.1, p.1-13, 2017.

HETTIARACHCHI P, et al. Dopamine Release Impairments Accompany Locomotor and Cognitive Deficiencies in Rotenone-Treated Parkinson's Disease Model Zebrafish. **Chemical research in toxicology**, v.35, n.11, p.1974-1982, 2022.

HOLZSCHUH, J. et al. Dopamine transporter expression distinguishes dopaminergic neurons from other catecholaminergic neurons in the developing zebrafish embryo. **Mechanisms of development**, v. 101, p. 237-243, 2001.

HOWE K, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v.496, n.7446, p.498-503, 2013.

HU, Z. et al. Up-regulation of autophagy-related gene 5 (ATG5) protects dopaminergic neurons in a zebrafish model of Parkinson's disease. **Journal of Biological Chemistry**, v.292, n.44, p.18062-18074, 2017.

IBARRA-GUTIÉRREZ M, et al. Rotenone-Induced Model of Parkinson's Disease: Beyond Mitochondrial Complex I Inhibition. **Molecular Neurobiology**, v.60, n.4, p.1929-1948, 2023.

ILIE O. D. et al. Assessing Anti-Social and Aggressive Behavior in a Zebrafish (*Danio rerio*) Model of Parkinson's Disease Chronically Exposed to Rotenone. **Brain Sciences**, p. 898, 2022.

INNOS J; HICKEY M. Using Rotenone to Model Parkinson's Disease in Mice: A Review of the Role of Pharmacokinetics. **Chemical research in toxicology**, v.34, n.5, p.1223-1239, 2021.

ISAACSON, S.H. et al. Dopamine Agonists in Parkinson's Disease: Impact of D1-like or D2-like Dopamine Receptor Subtype Selectivity and Avenues for Future Treatment. **Clinical Parkinsonism & Related Disorders**, p.100212, 2023.

JÚNIOR, J. et al. Manejo dos Sintomas Não Motores na Doença de Parkinson. **Revista Científica Hospital Santa Izabel**, v.6, n.1, p.12-23, 2022.

KALUEFF, A. V. et al. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 70-86, 2013.

KALUEFF, A. V. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in pharmacological sciences**, v. 35, n. 2, p. 63-75, 2014.

KALUEFF A, et al. Gaining translational momentum: more zebrafish models for neuroscience research. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.55, p.1-6, 2014.

KALYN M, et al. Comprehensive Analysis of Neurotoxin-Induced Ablation of Dopaminergic Neurons in Zebrafish Larvae. **Biomedicines**, v.8, n.1, p.1, 2019.

KALYN M; EKKER M. Cerebroventricular Microinjections of MPTP on Adult Zebrafish Induces Dopaminergic Neuronal Death, Mitochondrial Fragmentation, and Sensorimotor Impairments. **Frontiers in Neuroscience**, v.15, p.718244, 2021.

KESH S, et al. Hesperidin downregulates kinases Irfk2 and gsk3 β in a 6-OHDA induced Parkinson's disease model. **Neuroscience Letters**, v.740, p.135426, 2021.

KHOTIMAH H, et al. Zebrafish Parkinson's model: rotenone decrease motility, dopamine, and increase α -synuclein aggregation and apoptosis of zebrafish brain. **International Journal of PharmTech Research**, v.4, p.614-21, 2015.

KUMARESAN, Maithrayie; KHAN, Safeera. Spectrum of non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Cureus**, v. 13, n. 2, 2021.

LAM C, et al. Zebrafish embryos are susceptible to the dopaminergic neurotoxin MPTP. **European Journal of Neuroscience**, v.21, n.6, p.1758-1762, 2005.

LANGSTON J, et al. The MPTP Story. **Journal of Parkinson's disease**, v.7, n.1, p.S11-S19, 2017.

LARIJANI, B. et al. The Design and Application of an Appropriate Parkinson's Disease Animal Model in Regenerative Medicine. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 1341, p. 89-105, 2019.

LI, L. and DOWLING, J.E. Effects of dopamine depletion on visual sensitivity of zebrafish. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 5, p.1893-1903, 2000.

LIESCHKE, Graham J.; CURRIE, Peter D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 5, p. 353-367, 2007.

LIU, Qianqian et al. Resveratrol synergizes with low doses of L-DOPA to improve MPTP-induced Parkinson disease in mice. **Behavioural brain research**, v. 367, p. 10-18, 2019..

LIU Y. Zebrafish as a Model Organism for Studying Pathologic Mechanisms of Neurodegenerative Diseases and other Neural Disorders. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 2023.

LIN B, et al. Advances in Zebrafish for Diabetes Mellitus with Wound Model. **Bioengineering**, v.10, n.3, p.330, 2023.

MACPHAIL R, et al. Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. **Neurotoxicology**, v.30, n.1, p.52-58, 2009.

MADSEN D, et al. Interaction between Parkin and α -Synuclein in PARK2-Mediated Parkinson's Disease. **Cells**, v.10, n.2, p.283, 2021.

MELO K, et al. Short-term exposure to low doses of rotenone induces developmental, biochemical, behavioral, and histological changes in fish. **Environmental science and pollution research international**, v.22, p.13926-13938, 2015.

MEREDITH, G. E.; KANG, Un Jung. Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. **Movement disorders**, v. 21, n. 10, p. 1595-1606, 2006.

MUTHUSAMY S, et al. Protective Effect of Annona Squamosa Fruit Pulp on Motor Responses Following Intra-Medial Forebrain Bundle Injection of 6-Ohda In Rat Model of Parkinson Disease. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v.17, n.2, p.835-849, 2023.

NAJIB, N. H. M. et al. The effects of metallothionein in paraquat-induced Parkinson disease model of zebrafish. **International Journal of Neuroscience**, v. 133, n. 8, p. 822-833, 2023.

NARAYAN S, et al. Occupational pesticide use and Parkinson's disease in the Parkinson Environment Gene (PEG) study. **Environment international**, v.107, p.266-273, 2017.

NASKAR A, et al. Global Trends in the Incidence, Prevalence, and Years Lived With Disability of Parkinson's Disease in 204 Countries/Territories From 1990 to 2019. **Frontiers in Public Health**, v.9, n.776847, p.1-16, 2021.

NERY L, et al. Brain intraventricular injection of amyloid- β in zebrafish embryo impairs cognition and increases tau phosphorylation, effects reversed by lithium. **PLoS One**, v.9, n.9, p.105862, 2014.

NUNES M, et al. Chronic Treatment with Paraquat Induces Brain Injury, Changes in Antioxidant Defenses System, and Modulates Behavioral Functions in Zebrafish. **Molecular neurobiology**, v.54, p.3925-3934, 2017.

OBESO J, et al. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. **Movement Disorders**, v.32, n.9, p.1264-1310, 2017.

OECD, Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing**, (July), p.1–22, 2013.

OLIVEIRA, C.M.; GRESSLER, L.T.; FERREIRA, M.V.A.L.; WHITTON, R.G.M. (2023) Capítulo 5 - Peixes I: Lambari, tilápia e zebrafish. pp. 330-383. In: WINTER, L.M.F. (coord.) VIANA, A. A.B.; DE ANGELIS, K.; BRAGA, L.M.G.M. (organizadores) Guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica/Concea. 1ª ed. Brasília/DF. **Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação**, 1107p.

OLIVEIRA J, et al. Relação entre a exposição ao pesticida Rotenona e o desenvolvimento de sintomas motores e não motores da doença de Parkinson. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v.9, n.9, p.706997917-706997917, 2020.

OLIVEIRA R. Mind the fish: zebrafish as a model in cognitive social neuroscience. **Frontiers in neural circuits**, v.7, p.131, 2013.

ORGER, Michael B.; DE POLAVIEJA, Gonzalo G. Zebrafish behavior: opportunities and challenges. **Annual review of neuroscience**, v. 40, p. 125-147, 2017.

OU, Zejin et al. Global trends in the incidence, prevalence, and years lived with disability of Parkinson's disease in 204 countries/territories from 1990 to 2019. **Frontiers in public health**, v. 9, p. 776847, 2021.

PATEL P, et al. Zebrafish-based platform for emerging bio-contaminants and virus inactivation research. **Science of The Total Environment**, v.872, p.162197, 2023.

PELKOWSKI S, et al. A novel high-throughput imaging system for automated analyses of avoidance behavior in zebrafish larvae. **Behavioural brain research** , v.223, n.1, p.135-144, 2011.

PHILLIPS, K. A. et al. Why primate models matter. **American journal of primatology**, v. 76, n. 9, p. 801-827, 2014.

POTASHKIN, J. A. et al. Limitations of Animal Models of Parkinson's Disease. **Parkinson's Disease**, v. 2011, p. 1–7, 2011.

RADAD K, et al. Rotenone: from modelling to implication in Parkinson's disease. **Folia Neuropathol**, v.57, n.4, p.317-326, 2019.

RAY, S. ; AGARWAL, P. Depression and anxiety in Parkinson disease. **Clinics in geriatric medicine**, v. 36, n. 1, p. 93-104, 2020.

RAZALI K, et al. The Promise of the Zebrafish Model for Parkinson's Disease: Today's Science and Tomorrow's Treatment. **Frontiers in Genetics**, v.12, p.655550, 2021.

RAZALI K, et al. Characterization of neurobehavioral pattern in a zebrafish 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced model: A 96-hour behavioral study. **PLoS One**, v.17, n.10, p.0274844, 2022.

ROBEA, Madalina-Andreea et al. Parkinson's disease-induced zebrafish models: focussing on oxidative stress implications and sleep processes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, 2020.

ROCHA, Savannah M. et al. Rotenone induces regionally distinct α -synuclein protein aggregation and activation of glia prior to loss of dopaminergic neurons in C57Bl/6 mice. **Neurobiology of Disease**, v. 167, p. 105685, 2022.

ROSE, J. D. The neurobehavioral nature of fishes and the question of awareness and pain. **Reviews in fisheries science**, v. 10, n. 1, p. 1-38, 2002.

ROSE, J. D. Anthropomorphism and 'mental welfare' of fishes. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 75, n. 2, p. 139-154, 2007.

RYMAN S; POSTON K. MRI biomarkers of motor and non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related disorders**, v.73, p.85-93, 2020.

SALEEM, Suraiya; KANNAN, Rajaretinam Rajesh. Zebrafish: Um Modelo Pré-Clínico Potencial para Pesquisa Neurológica em Biologia Moderna. In: Modelo Zebrafish para Pesquisa Biomédica . Cingapura: **Springer Nature Cingapura**, 2022. p. 321-345.

SAMPAIO, Cristina; CALDAS, A. Castro. Etiopatogenia da doença de Parkinson: a revolução do MPTP. **Acta Médica Portuguesa**, v. 1, n. 4-6, p. 304-307, 1988.

SASAOKA, M. et al. Rotenone-induced inner retinal degeneration via presynaptic activation of voltage-dependent sodium and L-type calcium channels in rats. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 969, 2020.

SCHNEIDER A, et al. Implementação de um Novo Modelo de Experimentação Animal-Zebrafish. **Pesquisa Clínica e Biomédica**, v.29, n.2, 2009.

SCHNÖRR, S. J. et al. Measuring thigmotaxis in larval *zebrafish*. **Behavioural brain research**, v. 228, n. 2, p. 367-374, 2012.

SEDELIS, M. et al. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Behavioural brain research**, v. 125, n. 1-2, p. 109-125, 2001.

SÉGALAT, L. Invertebrate Animal Models of Diseases as Screening Tools in Drug Discovery. **ACS Chemical Biology**, v. 2, n. 4, p. 231–236, 2007.

SHAHNAWAZ M, et al. Discriminating α -synuclein strains in Parkinson's disease and multiple system atrophy. **Nature**, v.578, n.7794, p.273-277, 2020.

SILVA, P. F. et al. Different housing conditions for zebrafish: What are the effects?. **Behavioural Processes**, v. 209, p. 104886, 2023.

SILVEIRA T, et al. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v.64, n.2, p.4-5, 2012.

SINHA P, et al. Neuroinflammation During Parkinson's Disease: Key Cells and Molecules Involved in It. **Inflammation: the Common Link in Brain Pathologies**, p.185-208, 2016.

SON, Ok-Lye et al. Cloning and expression analysis of a Parkinson's disease gene, *uch-L1*, and its promoter in zebrafish. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 312, n. 3, p. 601-607, 2003.

SOUZA, A. M. et al. "Embryotoxicity and visual-motor response of functionalized nanostructured hydroxyapatite-based biomaterials in zebrafish (*Danio rerio*)." **Chemosphere**, v. 313, p. 137519, 2023.

SPENCE R, et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological reviews of the Cambridge philosophical society**, v.83, n.1, p.13-34, 2008.

TATTON, W. G. et al. MPTP produces reversible disappearance of tyrosine hydroxylase-containing retinal amacrine cells. *Brain research*, v. 527, n. 1, p. 21-31, 1990.

THIRUGNANAM, Thilaga; SANTHAKUMAR, Kirankumar. Chemically induced models of Parkinson's disease. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 252, p. 109213, 2022.

ÜNAL İ; EMEKLI-ALTURFAN E. Fishing for Parkinson's Disease: A review of the literature. **Journal of Clinical Neuroscience**, v.62, p.1-6, 2019.

VACCARI C, et al. Paraquat and Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Parte B**, v.22, n.5-6, p.172-202, 2019.

VAZ R, et al. Zebrafish as an Animal Model for Drug Discovery in Parkinson's Disease and Other Movement Disorders: A Systematic Review. **Frontiers in neurology**, v.9, p.347, 2018.

VIJAYANATHAN Y, et al. 6-OHDA-Lesioned Adult Zebrafish as a Useful Parkinson's Disease Model for Dopaminergic Neuroregeneration. **Neurotoxicity research**, v.32, p.496-508, 2017.

WANG L, et al. Isoliquiritigenin induces neurodevelopmental-toxicity and anxiety-like behavior in zebrafish larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 266, p. 109555, 2023.

WANG X, et al. Advances of zebrafish in neurodegenerative disease: from models to drug discovery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 713963, 2021.

WANG Y, et al. Motor and Non-Motor Symptoms Resembling Parkinson's Disease in Rotenone-Treated Zebrafish. **Neurotoxicology**, v. 58, p.103-109, 2017.

ZENG X, et al. Cellular and Molecular Basis of Neurodegeneration in Parkinson Disease. **Frontiers in aging neuroscience**, v.10, p.109, 2018.

ZHANG, X. et al. Methylene blue prevents neurodegeneration caused by rotenone in the retina. **Neurotoxicity research**, 9, p. 47-57, 2006.

ZIMMERMANN F, et al. Oxytocin reversed MK-801-induced social interaction and aggression deficits in zebrafish. **Behavioural brain research**, v.311, p.368-374, 2016.

ANEXO – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS PROTOCOLO 3581030221



**UNIVERSIDADE
FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO**

Universidade Federal Rural de Pernambuco

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO : EMENDA v10/07/2023

Certificamos que a EMENDA (versão de 10/07/2023) da proposta intitulada "Estudo da associação da Levodopa com óleo essencial de Piper nigrum de forma livre e em nanoemulsão como um novo produto para o tratamento da Doença de Parkinson utilizando zebrafish (Danio rerio) como modelo animal", CEUA nº 3581030221 (ID 032679), sob a responsabilidade de **Pabyton Gonçalves Cadena e equipe; André Lucas Corrêa de Andrade; Renatta Priscilla Ferreira Silva; Aline Amanda da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos vigentes para sua apresentação, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo assim **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFRPE) em 09/08/2023.

Término previsto: 03/2024

Origem: Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal - LECA			
Espécie: Peixes	sexo: Machos e Fêmeas	idade: 3 a 12 meses	Quantidade mantida: 0
Linhagem: WT (selvagem)		Peso: 1 a 2 g	
Origem: Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal - LECA			
Espécie: Peixes	sexo: Machos e Fêmeas	idade: 1 a 7 dias	Quantidade mantida: 0
Linhagem: WT (selvagem)		Peso: 1 a 1 g	

ANIMAIS UTILIZADOS

	Total Aprovado	Quantidade Utilizada
Peixes Machos e Fêmeas	2800	0

Recife, 11 de outubro de 2023

Prof. Dr. Carlos Fernando Rodrigues Guaraná
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Rural de Pernambuco

