



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# Estudos preliminares para o desenvolvimento de um modelo animal alternativo para a doença de Parkinson

Versão final após defesa

**Diana Fajardo Marques**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Biotechnologia**  
(2.º ciclo de estudos)

**Orientador: Prof. Doutor M. Ramiro Pastorinho**  
**Co-orientador: Doutora Ana Clara Cristóvão**

Covilhã, março de 2020



# Agradecimentos

Aos meus orientadores, Professor Doutor Ramiro Pastorinho e Doutora Ana Clara Cristóvão, e à Doutora Ana Catarina Sousa, o meu muito obrigada por toda a ajuda, apoio científico, pela vossa disponibilidade em me ajudarem e pelo apoio emocional ao longo do meu trabalho desenvolvido, e por me receberem tão bem no grupo de investigação.

A todos os colegas do STEELab por toda a ajuda, mas um especial obrigada à Susana, ao Celso e à Letícia por toda a ajuda durante o trabalho desenvolvido, não só a nível laboratorial, mas também por me sempre apoiarem quando as coisas não estavam a correr tão bem e por tornarem o laboratório num lugar alegre, em que se trabalha sempre com boa disposição.

Aos meus pais, Mário e Cláudia, por serem os pilares da minha vida, que sempre me apoiaram em tudo e fazem o possível e o impossível por mim e pela minha irmã, sem eles eu não seria a pessoa que sou hoje e nada faria sentido.

À minha irmãzinha, Inês, que apesar das nossas discussões, é umas das pessoas mais importantes da minha vida, que me apoia sempre, que nunca me deixa ir a baixo e com quem sempre posso contar.

Aos meus avós, António e Fernanda, que me viram crescer e me apoiaram em todo o meu percurso, e também ao meu avô Joaquim, que apesar de não ter conseguido ver o final do meu percurso académico, sempre me apoiou até o final da sua vida e sei que estaria orgulhoso ao ver o final desta etapa.

À minha tia Ludovina e aos meus primos, Cândida, Orlando, Ana, Diana, João, Leonor e Eduardo, por sempre que os ia visitar nos fins de semana que não ia a casa, me conseguirem sempre me alegrar e descontraír, mas também me respeitarem o meu tempo de estudo e sempre me apoiarem em tudo o que precisava.

A todos os restantes familiares, que de uma forma ou de outra, me apoiaram como puderam.

À Tatiana, Liliana, Sofia, Dany, Fátima, Nuno, Diogo, Adriene, Carolina, Inês e ao Tiago por todas as conversas, por todas as risadas, os momentos de descontração, pelo apoio e carinho que sempre me deram e, principalmente por estarem sempre presentes na minha vida.

A todos os meus colegas de curso que, duma maneira ou outra, me ajudaram de várias maneiras.

Trabalho financiado pelo Projeto ICON: "Interdisciplinary Challenges on Neurodegeneration" (Ref. CENTRO-01-0145-FEDER-000013) e pelo Projeto UID/Multi /00709/2013.



## Resumo

A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa causada pela perda de neurónios dopaminérgicos. Tradicionalmente, têm sido utilizados animais vertebrados, maioritariamente roedores, no estudo desta doença. Existem vários modelos disponíveis, incluindo o modelo com o pesticida paraquato. No entanto, a experimentação animal com vertebrados tem sido objecto de forte regulamentação, só sendo autorizada quando não existe alternativa não animal disponível. Assim, o desenvolvimento e validação de modelos animais alternativos reveste-se de particular importância. A *Daphnia magna* é um invertebrado aquático, que possui a homologia genética mais elevada com o homem de entre os não vertebrados, e para a qual já foi comprovada a existência de neurónios dopaminérgicos. No âmbito da presente tese, o pesticida paraquato foi usado como substância modelo. Foram realizados testes agudos de acordo com a norma 202 da OECD e foi avaliado o impacto na sobrevivência de *Daphnia* e em termos de alterações de movimento. Os resultados obtidos demonstram que existe uma grande variação nos valores de EC<sub>50</sub> (Concentração responsável pela imobilização de 50% dos animais). Essa variação foi atribuída à idade das *Daphnia* expostas. Apesar da norma da OCDE indicar que os ensaios devem ser realizados com neonatos com menos de 24h, os resultados obtidos demonstram claramente que esse intervalo deve ser reajustado uma vez que diferenças relativamente reduzidas (i.e., duas horas) na idade dos neonatos são responsáveis por diferenças nos valores de EC<sub>50</sub>. Relativamente às alterações no movimento foi possível observar uma tendência de aumento no movimento (em termos de deslocamento) em função da idade dos neonatos para a mesma concentração de paraquato. Foi ainda possível observar uma diminuição no movimento com o aumento da concentração de paraquato para neonatos com a mesma idade.

De uma forma geral, este trabalho demonstrou a *Daphnia magna* apresenta várias características que a tornam um bom modelo para o estudo da doença de Parkinson, no entanto, é necessário um ajuste ao protocolo da OECD e são necessários mais estudos particularmente em termos de alterações de movimento.

## Palavras-chave

Doença de Parkinson; *Daphnia magna*; paraquato; modelo alternativo; OCDE.



# Abstract

Parkinson disease is a neurodegenerative disease caused by the loss of dopaminergic neurons. Traditionally, vertebrate animals, mostly rodents, have been used to study this disease. There are several models available, including the model with the pesticide paraquat. However, animal experimentation with vertebrates has growingly been regulated, only being authorized when no other alternative is available. Therefore, the development and validation of animal alternative models are of a particular significance.

*Daphnia magna* is an aquatic invertebrate, that has the highest genetic homology with humans among non vertebrates, and for which it has been verified the existence of dopaminergic neurons. In this thesis, the pesticide paraquat had been used as model substance. Acute toxicity tests were performed according to the guideline 202 of OECD and the impact in the survival and motion changes of *Daphnia* were evaluated. The results obtained demonstrate that the values of EC<sub>50</sub> (Concentration responsible for the immobilization of 50% of the animals) vary widely. That variation was attributed to the age of the exposed *Daphnia*. Although the OECD guideline indicates that the assays must be performed with neonates younger than 24 hours, our results clearly demonstrate that this age range should be narrowed since comparatively small variations (i.e., two hours) in the age of the newborns is responsible for differences in EC<sub>50</sub> values.

Concerning alterations in movement, it was possible to observe that older *Daphnia* display higher levels of movement (in terms of displacement). It was also possible to observe that, for neonates with the same age, there was a reduction in movement with increasing concentrations of paraquat.

In a general, this work demonstrates that *Daphnia magna* presents characteristics that makes it a good alternative animal model for the study of Parkinson disease. Although, it is required an adjustment to the OECD's protocol and further research is necessary, particularly studies related with movement alterations.

## Keywords

Parkinson Disease; *Daphnia magna*; paraquat; alternative model; OECD.



# Índice

1.	Introdução .....	1
1.1.	Sistema nervoso e movimento .....	1
1.2.	Doença de Parkinson .....	3
1.3.	Modelos animais para o estudo da doença de Parkinson .....	5
1.3.1.	<i>Daphnia magna</i> .....	6
2.	Objetivo .....	11
3.	Métodos .....	12
3.1.	Cultura de <i>Daphnia magna</i> .....	12
3.2.	Testes agudos .....	12
3.2.1.	Teste agudo com tóxico de referência .....	12
3.2.2.	Teste agudo - Paraquato.....	13
3.2.2.1.	Ensaio 1 .....	13
3.2.2.2.	Ensaio 2 .....	13
3.2.2.3.	Ensaio 3 .....	14
3.3.	Batimento cardíaco.....	14
3.4.	Alterações do movimento .....	14
4.	Resultados .....	16
4.1.	Teste agudo com dicromato de potássio .....	16
4.2.	Testes agudos com Paraquato - Imobilização.....	16
4.3.	Testes agudos com Paraquato - Batimento cardíaco .....	22
4.4.	Testes agudo com Paraquato - Movimento.....	23
5.	Discussão .....	26
6.	Conclusão .....	29
	Referências Bibliográficas.....	30



# Lista de Figuras

Figura 1: Representação do grupo subcortical designado de gânglio da base. (Colder, 2015) ..	1
Figura 2: Representação das vias direta e indireta que ocorrem nos gânglios da base. GPe, <i>globus pallidus</i> externo; STN, núcleo subtalâmico; SNr, <i>substantia nigra pars reticulata</i> (Kravitz & Kreitzer, 2012). .....	2
Figura 3: Biossíntese de neurotransmissores catecolaminérgicos (Daubner et al., 2011). .....	3
Figura 4: Mecanismo de ação do paraquato e de outros neurotóxicos nas células dopaminérgicas. (Bové & Perier, 2012) .....	5
Figura 5: Região cefálica do sistema nervoso em <i>Daphnia magna</i> . Legenda: ant- antennula, bc-“bulged cells” (células entumescidas), ce- olho composto, dFO- órgão dorso-frontal, fF- filamento frontal, la-lâmina, lsc- células secretoras do labro, npe- olho naupliar, og- gânglio óptico, proto - protocérebro, tc- tectum, trito - tritocérebro, * - deutocérebro. ....	7
Figura 6: Agrupamentos de células emparelhados nos lobos ópticos e no cérebro, revelado pelo marcador nuclear <i>Hoechst</i> e contraste de <i>synapsin-ir</i> para neutrófilos: a-plano frontal ventral, b- plano frontal médio, c-plano frontal dorsal. Escala 25 $\mu$ m (Kress et al., 2016) .....	8
Figura 7: Neurónios dopaminérgicos no gânglio óptico e no cérebro central da <i>Daphnia magna</i> revelados por imunohistoquímica de tirosina hidroxilase (TH).. .....	10
Figura 8: Esquema representativo dos ensaios realizados. ....	13
Figura 9: Imagem demonstrativa das filmagens efetuadas para registar o movimento dos organismos teste.....	15
Figura 10: Impressão de ecrã do aspeto gráfico do software Traker. Este exemplo apresenta, na imagem central, os trajetos de todos os organismos do Controlo com a idade de 20h. Os gráficos reportam à deslocação total e amplitude de movimentos (relativa a um eixo ortogonal arbitrariamente estabelecido no centro da imagem) do organismo número 3 (D3), cujo trajeto está representado a verde na imagem. ....	15
Figura 11: Gráfico representativo dos $EC_{50}$ obtidos em função das diferentes ninhadas utilizadas nos testes. ....	17
Figura 12: Gráfico representativo dos resultados do $EC_{50}$ às 24h em testes agudos em que são utilizados neonatos com diferentes idades. Os resultados de neonatos provenientes de dáfnias saudáveis estão assinalados a azul e a laranja estão assinalados os resultados obtidos com neonatos provenientes de dáfnias com menor sucesso reprodutivo (<40 neonatos/ninhada). .	18
Figura 13: Gráfico representativo dos resultados do $EC_{50}$ às 48h em testes agudos em que são utilizados neonatos com diferentes idades. Os resultados de neonatos provenientes de dáfnias saudáveis estão assinalados a cinzento e a amarelo estão assinalados os resultados obtidos com neonatos provenientes de dáfnias com menor sucesso reprodutivo (<40 neonatos/ninhada). ....	18
Figura 14: Gráficos representativos da imobilização da <i>Daphnia magna</i> quando em contacto com as diferentes concentrações de paraquato: A - neonatos com 2h; B- neonatos com 4h; C-	

neonatos com 8h; D-neonatos com 12h; E- neonatos com 16h; F-neonatos com 20h; G- neonatos com 24h. ....	20
Figura 15: Gráfico representativo dos resultados de EC <sub>50</sub> às 24h e 48h para os neonatos com as diferentes idades testadas. ....	21
Figura 16: Gráfico representativo do número de dáfnias vivas por concentração em função da idade. O nº total de animais por concentração foi de 25. ....	22
Figura 17: Número médio de batimentos cardíacos por concentração em cada teste realizado. ....	23
Figura 18: Resultados do deslocamento registado por <i>Daphnia magna</i> com 2, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas de vida sujeita a uma concentração de 4 mg.L <sup>-1</sup> de paraquato durante 24h. ....	24
Figura 19: Resultados do deslocamento registado por <i>Daphnia magna</i> com 20 horas de vida quando sujeita a concentrações de 4, 8 e 12 mg.L <sup>-1</sup> de paraquato durante 24h. ....	24
Figura 20: Gráfico representativo da variação de EC <sub>50</sub> em função da idade dos s neonatos utilizados nos testes agudos. ....	27

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Resultados obtidos no teste agudo com dicromato de potássio .....	16
Tabela 2: Resultados de EC <sub>50</sub> às 48h obtidos com neonatos com idade inferior a 24h. ....	16
Tabela 3: Valores de EC <sub>50</sub> obtidos para neonatos com diferentes idades, com indicação da ninhada usada (N) e do número médio de neonatos por ninhada (Nº neo). ....	17
Tabela 4: Resultados obtidos de EC <sub>50</sub> às 24h e às 48h dos testes realizados com neonatos com diferentes idades. ....	21
Tabela 5: Número de batimentos cardíacos por minuto nos diferentes testes agudos para cada concentração. ....	22
Tabela 6: Valores de EC <sub>50</sub> descritos na literatura obtidos em testes agudos com neonatos de <i>Daphnia magna</i> após exposição a paraquato. ....	26
Tabela 7: Conclusões de batimento cardíaco quando o organismo <i>Daphnia</i> encontra-se exposta a diferentes pesticidas descritos na literatura. ....	27
Tabela 8: Alterações de movimento em <i>Daphnia</i> com diferentes substâncias descritos na literatura .....	28
Tabela 9: Reagentes necessários para a preparação das soluções stock utilizadas para ASTM.36	



# Lista de Acrónimos

**ant** - antennula

**ASTM** - American Society for Testing and Materials

**bc** - “bulged cells” (células entumescidas),

**BMMA** - beta-metil-amino-L-alanina

**ce**- olho composto

**D1R** - recetores de dopamina do tipo 1

**D2R** - recetores de dopamina do tipo 2

**dFO**- órgão dorso-frontal

**DOPA** - Di-hidroxilfenilalanina

**fF**- filamento frontal

**GPe** - globus pallidus externo

**la**-lâmina

**lsc**- células secretoras do labro

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

**npe**- olho naupliar

**O2•-** - radical superóxido

**OCDE** - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

**og**- gânglio óptico

**PQ•+** - monacatião radial livre de paraquato

**proto** - protocérebro

**PT**- tratos protocerebrais

**SNr** - substantia nigra pars reticulata

**STN** - núcleo subtalâmico

**tc**- tectum

**trito** - tritocérebro

**VT** - tectum visuais



# 1. Introdução

## 1.1. Sistema nervoso e movimento

O sistema nervoso possui diversas funções, sendo uma dessas funções o movimento. A modulação do movimento encontra-se associada a um grupo subcortical designado de gânglio da base. Este grupo apresenta, para além desta função principal, outras funções, tais como aprendizagem motora, funções comportamentais e emoções (Lanciego, Luquin, & Obeso, 2012). Os gânglios da base apresentam circuitos que ligam o córtex cerebral e o tálamo. Este grupo subcortical encontra-se dividido em: estriado (*putamen* e *caudate*), sendo este subgrupo que recebe as informações vindas de diversas origens, nomeadamente 1) fontes corticais, talâmicas ou nigrais; 2) *globus pallidus* interno e *substantia nigra pars reticulata*, sendo que estas estruturas consistem no output, e enviam as informações dos gânglios da base para o tálamo; 3) núcleo intrínseco, que consiste no *globus pallidus* externo e na *substantia nigra pars compacta*, que se encontra entre as estruturas input e as do output. (Lanciego et al., 2012), (DeLong, 1990).

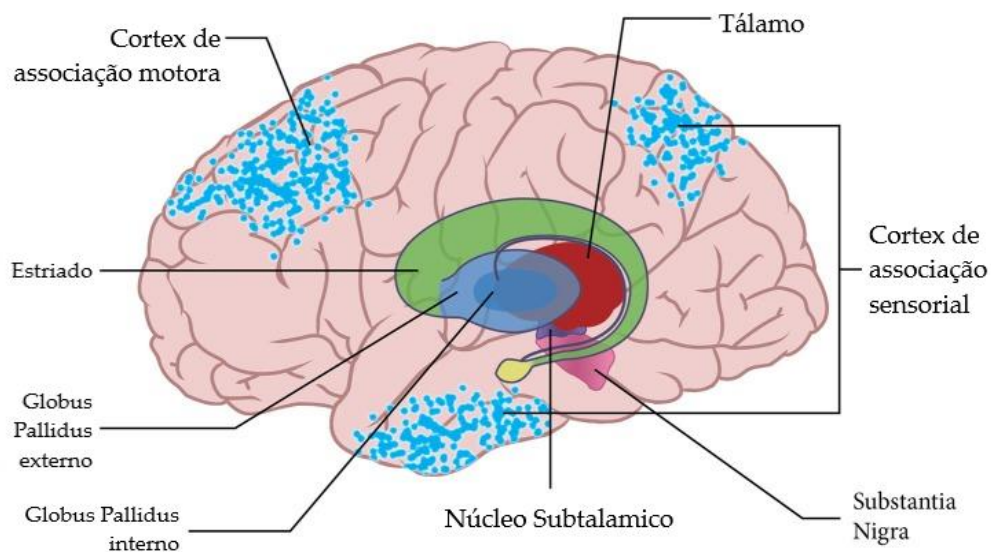


Figura 1: Representação do grupo subcortical designado de gânglio da base. (Adaptado de (Colder, 2015))

Os gânglios da base recebem os inputs a partir do córtex cerebral e enviam os outputs para o cerebelo e medula espinal através do tálamo. Estes inputs são enviados através de projeções glutamérgicas, ou seja, projeções excitatórias. Os inputs são recebidos no *putamen* por células designadas de neurónios médios espinhosos. Quando estas células recebem os inputs, estes tornam-se ativos, libertando neurotransmissores que regulam o movimento. Os neurónios médios espinhosos usam GABA como neurotransmissor, sendo então estes neurónios inibitórios. Após a ativação dos neurónios médios espinhosos do *putamen*, o circuito ocorre por duas vias:

a via direta e a via indireta. Na via direta, as projeções inibitórias a partir do putamen atingem diretamente as estruturas do output (*globus pallidus interno* e *substantia nigra pars reticulata*). Após a inibição das estruturas do output, estas não irão projetar o seu efeito no tálamo, ou seja, acaba o seu efeito inibitório no tálamo. Assim, o tálamo, projeta terminais neuronais excitatórios para o córtex. Entretanto, na via indireta, as projeções neuronais inibitórias a partir do putamen inibem primeiro os neurónios existentes do *globus pallidus* externo, que de seguida leva à desinibição do núcleo subtalâmico, ou seja, o *globus pallidus* externo não exerce o seu efeito inibitório no núcleo subtalâmico. Assim sendo, o núcleo subtalâmico exerce um efeito excitatório no *globus pallidus* interno e na substância nigra pars reticulata. Esta ativação faz com que exerça o efeito inibitório no tálamo, que conseqüentemente, não exerce o seu efeito excitatório no córtex. Sendo assim, as vias direta e indireta possuem funções opostas, sendo que a direta tem como função facilitar o movimento, enquanto que a indireta inibe o movimento (J. Park, 2016), (Alexander & Crutcher, 1990; Colder, 2015; DeLong, 1990; Lanciego et al., 2012).

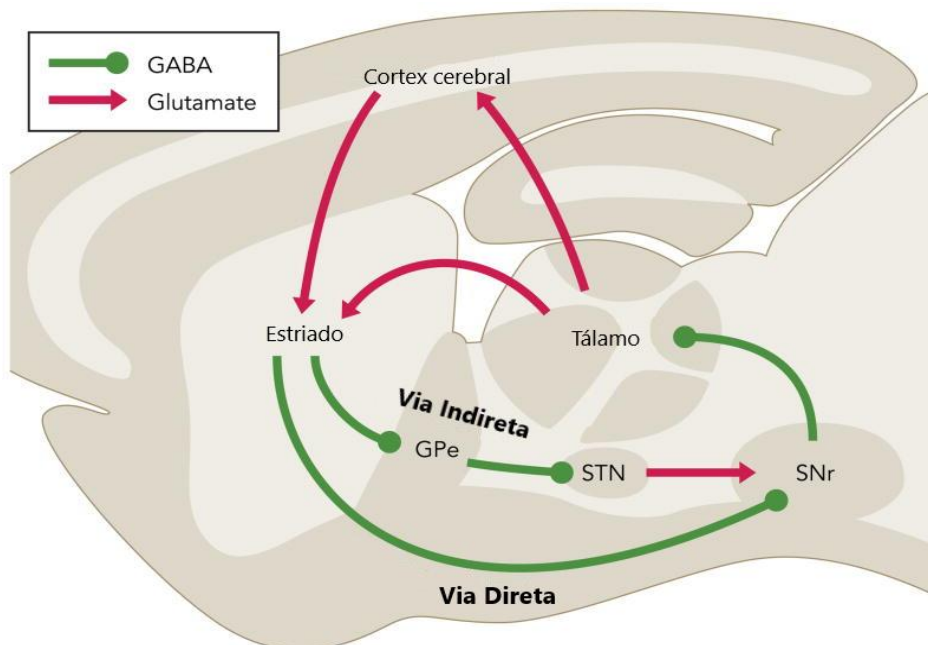


Figura 2: Representação das vias direta e indireta que ocorrem nos gânglios da base. GPe, *globus pallidus* externo; STN, núcleo subtalâmico; SNr, *substantia nigra pars reticulata* (Adaptado de (Kravitz & Kreitzer, 2012)).

Dentro dos gânglios basais, encontra-se também associado outro circuito. Este circuito envolve as células dopaminérgicas que se encontram na *substantia nigra pars compacta*. A dopamina é uma catecolamina e um neurotransmissor presente no sistema nervoso central, responsável pelo controlo das emoções, atenção, memória e movimento (Daubner, Le, & Wang, 2011). A sua síntese encontra-se representada na Figura 1. A dopamina apresenta a função de modular a plasticidade sináptica, isto é, consegue controlar a necessidade de estímulos excitatórios e inibitórios das vias direta e indireta, tendo assim um efeito dual nos neurónios médios espinhosos do estriado. Os neurónios médios espinhosos do estriado que se encontram

relacionados com a via indireta expressam recetores de dopamina do tipo 2 (D2R) e são responsáveis pelo efeito inibitório, enquanto que os neurónios médios espinhosos do estriado relacionados com a via direta manifestam recetores de dopamina do tipo 1 (D1R), responsáveis por modular o efeito excitatório (Lanciego et al., 2012). A perda de neurónios dopaminérgicos está associada a diversas patologias como é o caso da doença de Parkinson (Hayes, 2019; Lanciego et al., 2012; J. Park, 2016)

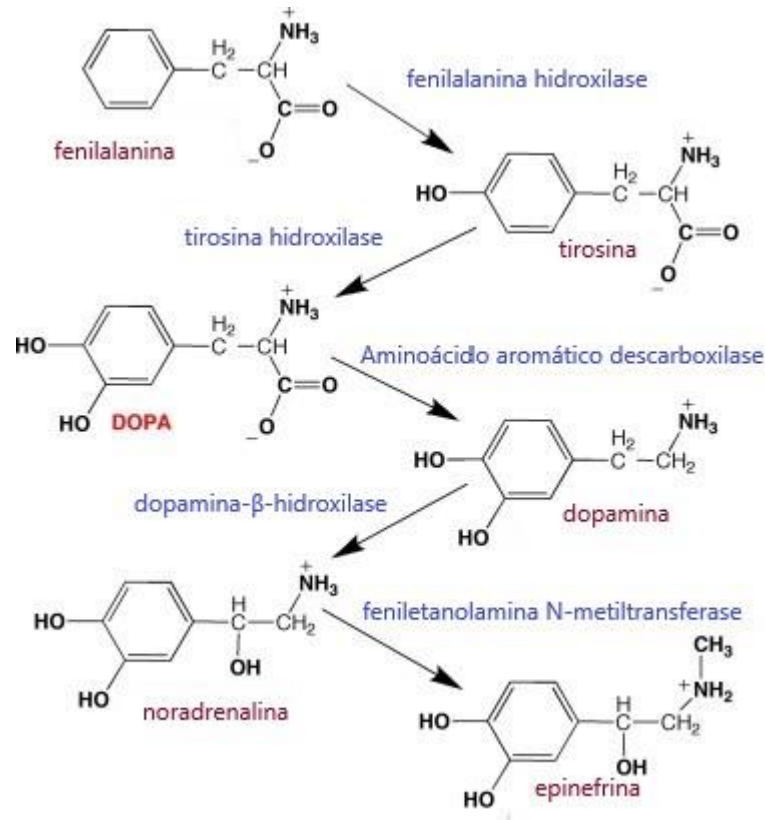


Figura 3: Biossíntese de neurotransmissores catecolaminérgicos (Adaptado de (Daubner et al., 2011)).

## 1.2. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson é uma das doenças neurodegenerativas mais comuns no mundo, sendo que 0,3% da população mundial apresentava esta patologia (Hayes, 2019). Esta doença neurodegenerativa afeta a população mais idosa (3% da população com mais de 80 anos apresenta esta doença neurodegenerativa)(Hayes, 2019).

A doença de Parkinson é manifestada através de sintomas motores (tremores, rigidez, bradicinesia, instabilidade postural) e também através de sintomas não motores (declínio cognitivo, depressão, ansiedade, falta de autonomia, demência, distúrbios de sono, etc) (Hayes, 2019; Kalia & Lang, 2015). A característica bioquímica desta doença, avaliada pós-morte, é a despigmentação da *substantia nigra pars compacta*, devido à perda de neurónios dopaminérgicos que se encontram aí localizados, que tem como consequência a diminuição dos

níveis de dopamina no circuito dos gânglios da base. Uma outra característica comum é a ocorrência de inclusões citoplasmáticas, designadas de corpos de Lewis, compostos principalmente por  $\alpha$ -sinucleína agregada.

Diversos fatores encontram-se associados ao aparecimento desta doença: idade, genética, meio ambiente (Hayes, 2019; Kalia & Lang, 2015; Vaz, Outeiro, & Ferreira, 2018). Estudos epidemiológicos demonstram que um dos fatores de risco para a doença de Parkinson é a exposição crónica a pesticidas usados na agricultura (Brouwer et al., 2017; Hayes, 2019; Lim et al., 2019; Moretto & Colosio, 2011).

Diversos modelos animais têm sido utilizados para estudar esta doença neurológica, sendo assim possível estudar os mecanismos da doença e possíveis estratégias terapêuticas. Os modelos mais comuns são primatas não humanos (Hurley, Elsworth, Whittaker, Roth, & Redmond, 2011), mas sobretudo os roedores (Hou et al., 2019) (ver seção 1.3). De modo a estudar a doença é necessário que ela seja induzida nos animais e para tal utilizam-se neurotóxicos de referência, como por exemplo rotenona, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Meredith, Sonsalla, & Chesselet, 2008; Moretto & Colosio, 2011) ou como recentemente proposto o paraquato (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina dicloreto), (Campos et al., 2013; Cristóvão, Choi, Baltazar, Beal, & Kim, 2009), um herbicida de amónio quaternário não-seletivo. Este herbicida é de ação rápida e tem como objetivo o controlo das ervas daninhas (Lou et al., 2012; Wang, Souders, Zhao, & Martyniuk, 2018). Devido à sua toxicidade, a utilização deste herbicida encontra-se proibida em 32 países, incluindo os países da União Europeia (Bové & Perier, 2012).

O paraquato possui uma elevada toxicidade, sendo que a sua exposição em grandes quantidades pode levar a problemas graves a nível respiratório, como fibrose pulmonar e falhas respiratórias (Lou et al., 2012). A sua exposição também causa diversos problemas a nível do sistema dopaminérgico. De facto, este herbicida possui uma grande similaridade com o neurotóxico MPTP (Lou et al., 2012). A toxicidade celular do paraquato dá-se principalmente através do ciclo redox. O paraquato é reduzido em monocatión radial livre de paraquato ( $PQ^{\bullet+}$ ), através de NADPH-citocromo P-450 redutase, NADPH-citocromo c redutase e do complexo mitocondrial I (NADH: ubiquinona oxedorredutase). O radical livre  $PQ^{\bullet+}$  sofre então uma reoxidação na presença de oxigénio, originando assim o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). A inibição mitocondrial promovida pela paraquato é responsável pela ativação da enzima NADPH oxidase 1 que contribui para um aumento de stress oxidativo. Estas espécies reativas irão causar diversos consequências a nível celular, como por exemplo a danificação da membrana celular através de peroxidação lipídica. (Dinis-Oliveira et al., 2006).

O paraquato está associado a diversos fenómenos que se encontram presentes na doença de Parkinson, como é o caso da degeneração dopaminérgica nigrostriatal, acumulação de  $\alpha$ -sinucleína (formação de corpos de Lewis), e neuroinflamação. (Marshall & Willett, 2018).

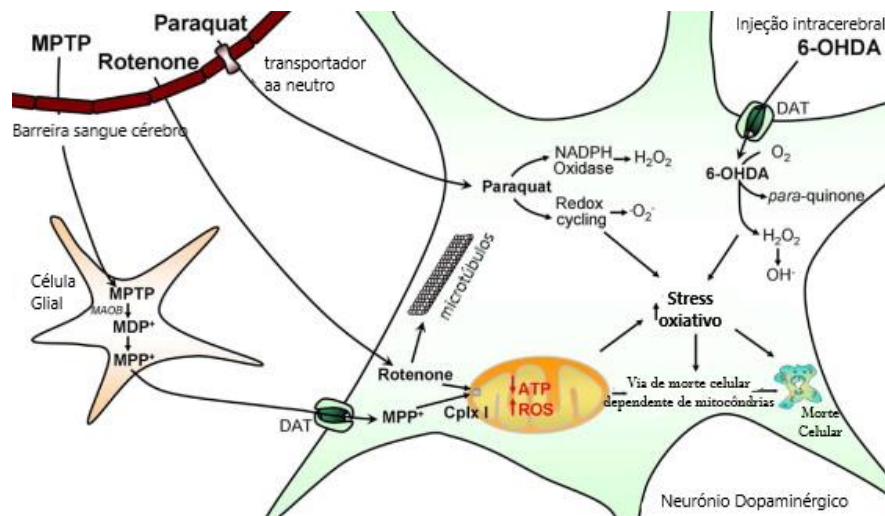


Figura 4: Mecanismo de ação do paraquat e de outros neurotóxicos nas células dopaminérgicas (Adaptado de (Bové & Perier, 2012)).

### 1.3. Modelos animais para o estudo da doença de Parkinson

Como referido anteriormente, os modelos animais mais estudados são mamíferos. No entanto, o seu uso tem vindo a ser regulamentado na Europa (DIRECTIVA 2010/63/EU) e, mais recentemente, nos Estados Unidos (Directive to Prioritize Efforts to Reduce Animal Testing, United States Environmental Protection Agency, September 2019).

A OCDE recomenda que “A utilização de animais para fins científicos ou educativos só deverá ... ser considerada quando não existir uma alternativa não animal”, sendo que a diretiva em vigor aplica-se a animais vertebrados não humanos vivos (nas forma larvares de alimentação autónoma e nas formas fetais de mamíferos a partir do último terço do seu desenvolvimento normal), e também a cefalópodes vivos, uma vez que também se encontra demonstrado que os últimos também têm a capacidade de demonstrar e sentir dor (DIRECTIVA 2010/63/UE DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 22 de Setembro de 2010 relativa à proteção dos animais utilizados para fins científicos).

Existem, neste momento, estudos em doença do Parkinson recorrendo a modelos animais alternativos. Existem três modelos animais alternativos: o peixe-zebra (Vaz et al., 2018), a mosca da fruta (Aggarwal, Reichert, & VijayRaghavan, 2019) e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Tenreiro, Franssens, Winderickx, & Outeiro, 2017). Contudo, estes modelos apresentam as suas desvantagens, sendo que o peixe-zebra é considerado vertebrado após as 72h de vida (Pyati, Look, & Hammerschmidt, 2007; Vaz et al., 2018), logo, encontra-se restringido pelas diretivas em vigor; a mosca da fruta tem associadas dificuldades de manuseamento e apresenta algumas limitações técnicas, especialmente a nível genético

(Whitworth, 2011); a levedura tem a desvantagem de apenas permitir o estudo da doença a nível celular (Tenreiro et al., 2017). Assim, o desenvolvimento de outros modelos animais alternativos que não exibam estas limitações torna-se particularmente importante.

### 1.3.1. *Daphnia magna*

*Daphnia magna*, conhecida vernaculamente como a “pulga-de-água” é um organismo invertebrado, pertencente ao Reino Animalia, Sub-reino Bilateria, Infra-Reino Protostomia, Super-Filo Ecdysozoa, Filo Arthropoda, Sub-Filo Crustacea, Classe Branchiopoda, Ordem Diplostraca, Sub-Ordem Cladocera, Infra-Ordem Anomopoda, Família Daphniidae, Género *Daphnia*, sendo a Espécie *Daphnia magna* Straus, 1820. Este organismo encontra-se no meio ambiente em lagos e pequenos charcos (Barrozo, Fowler, & Beckman, 2015). No entanto, tornou-se mais conhecido como organismo modelo em ambiente laboratorial graças à sua sensibilidade e gradatividade quando sujeito a substâncias tóxicas. Adicionalmente, a sua capacidade de reprodução por partenogénese (quando em condições ambientais estáveis - a base dos clones mantidos em cultura laboratorial por todo o mundo), associada a um ciclo de vida curto (maturidade sexual atingida ao décimo dia de desenvolvimento) e à produção de descendência abundante ( $\approx 40$  neonatos por ninhada), levou vários organismos regulatórios internacionais (e.g., ISO, ASTM, OCDE) a estabelecer protocolos validados (Colbourne et al., 2011; Siciliano, Gesuele, Pagano, & Guida, 2015).

A genotipagem de *D. pulex* (Colbourne et al, 2011) e, mais recentemente, de *D. magna* (Routtu et al, 2014) determinou que a *Daphnia* é o organismo invertebrado que apresenta a homologia mais elevada para genes modelo (90.4% vs 87.6% para *Drosophila melanogaster*) com o ser humano (Colbourne et al., 2011; Siciliano et al., 2015), tornando-a um modelo alternativo reconhecido pelo *National Institutes of Health* dos EUA para o estudo de doenças (Maxwell et al., 2014).

O sistema nervoso da *Daphnia magna* consiste no cérebro e no cordão nervoso ventral. O cordão nervoso ventral consiste em cadeias duplas de gânglios ligados através de conectivos (nervos que ligam gânglios) longitudinais e por junções transversais, tendo assim a aparência de uma escada (Fritsch, Bininda-Emonds, & Richter, 2013; Kirsch & Richter, 2007). Cada gânglio envia nervos para os diversos apêndices, sendo que as partes centrais do sistema nervoso enviam nervos para órgãos específicos: intestino, coração e órgãos sensoriais. O maior gânglio trata-se do cérebro, sendo também denominado por gânglio suprafaríngeo, que fornece nervos ao olho e ao ocelo (Fritsch et al., 2013; Kirsch & Richter, 2007).

O cérebro de *Daphnia* pode ser dividido em três partes: protocérebro, deutocérebro e o tritocérebro. O protocérebro compreende o órgão frontal e o *eyespot* (pequena mancha de pigmento associada à sensibilidade à luz, encontrada em muitos invertebrados) com os neurópilos I-III (neurópilo= rede densa de neurónios e células gliais), gânglio ótico e neurópilo

IV. O deutocérebro compreende o neurópilo V pertencente à anténula. O tritocérebro consiste nos centros das antennae (situado fora do cérebro nos conectivos esofágicos) (Sterba, 1957a,b in Smirnof, 2017).

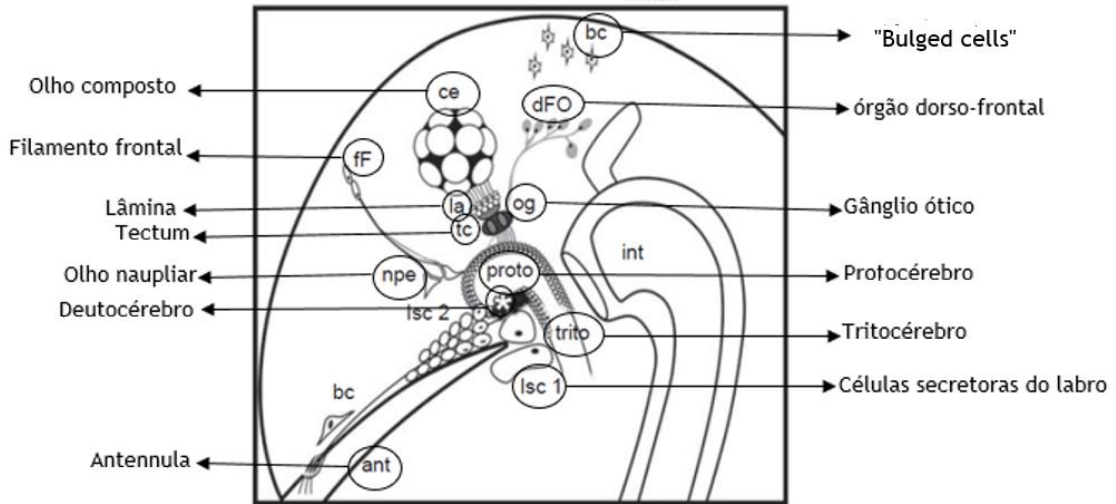


Figura 5: Região cefálica do sistema nervoso em *Daphnia magna*. Legenda: ant- anténula, bc-“bulged cells” (células entumescidas), ce- olho composto, dFO- órgão dorso-frontal, fF- filamento frontal, la- lâmina, lsc- células secretoras do labro, npe- olho naupliar, og- gânglio ótico, proto - protocérebro, tc- tectum, trito - tritocérebro, \* - deutocérebro.(Adaptado de (Smirnov, 2017))

Cada omatídio do olho composto da *Daphnia* (no total 22 omatídios) liga-se via nervo ótico até ao gânglio ótico. O gânglio ótico consiste em duas zonas de neurópilos, na lâmina não pareada e nas duas tectum visuais (VT) (também designadas de medula). Os tectum visuais ligam-se dorsalmente ao cérebro através de tractos protocerebrais (PT). O cérebro central inclui a parte central do protocérebro, o deutocérebro e o tritocérebro. O tritocérebro afila-se em direção ao cordão nervoso ventral. A partir das zonas protocerebrais, emergem nervos que se conectam com o olho naupliar (npe). No deutocérebro, encontra-se enraizado o nervo da antena 1 (a1n), enquanto que no tritocérebro encontra-se enraizado os dois ramos dos nervos da antena 2 (a2n1;a2n2).(Kress, Harzsch, & Dirksen, 2016)

Os corpos celulares neuronais encontram-se uniformemente distribuídos pelos gânglios óticos e pelo cérebro, parecendo formar uma única camada de células corticais. Esta camada de corpos celulares encontra-se separada parcialmente pelas zonas neuropilares e de tracto. Os aglomerados celulares foram identificados pela sua posição e pela sua composição (Kress et al., 2016).

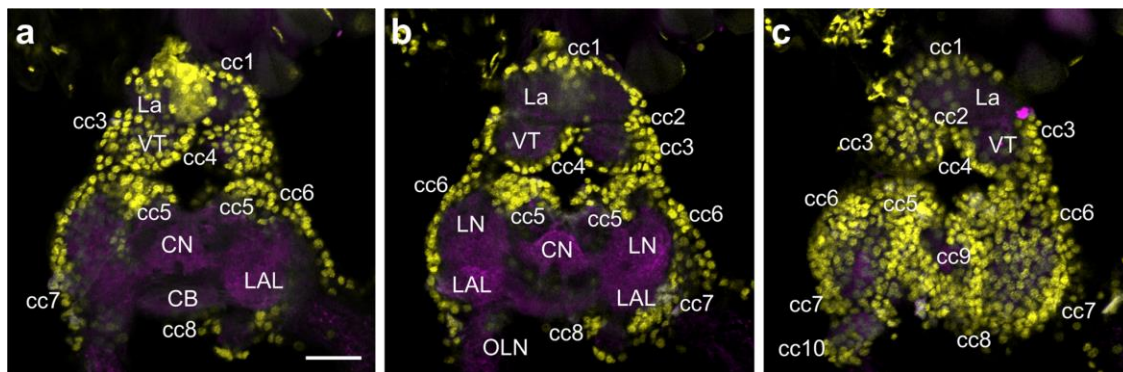


Figura 6: Agrupamentos de células emparelhados nos lobos ópticos e no cérebro, revelado pelo marcador nuclear *Hoechst* e contraste de *synapsin-ir* para neutrófilos: a-plano frontal ventral, b- plano frontal médio, c-plano frontal dorsal. Escala 25 µm (Adaptado de (Kress et al., 2016))

Uma das funções principais do sistema nervoso consiste na regulação neurosecretora e no controlo geral da atividade dos órgãos sensoriais. A maioria dos neurónios do sistema nervoso central da *Daphnia magna* são multifuncionais, indicando que este sistema é um sistema primitivo. Este organismo não apresenta estruturas para a liberação de neuro-hormonas para a hemolinfa, sendo que assim, as neurosecreções são liberadas pelos axónios.

O sistema nervoso da *Daphnia magna* consiste num sistema nervoso colinérgico. Os impulsos nervosos são transferidos pela acetilcolina a partir de terminações nervosas para órgãos particulares (Smirnov, 2017).

Têm sido estudadas as vias de sinalização que constituem a *Daphnia magna*, sendo uma dessas vias a via de sinalização dopaminérgica. Dierksen e seus colaboradores conseguiram identificar, através de diferentes técnicas, 73 neuropéptidos e hormonas proteicas (Dirksen et al., 2011).

Existem diversos neurotransmissores em *Daphnia magna*: aminas biogénicas (dopamina, serotonina, histamina e octopamina)(McCoole, Atkinson, et al., 2012), pequenas moléculas transmissoras (acetilcolina, GABA, glutamato), gases difusos (óxido nítrico, monóxido de carbono)(McCoole, D'Andrea, Baer, & Christie, 2012) e diversos neuropéptidos (alatostatina-A, FMRF-amida, taquicinina)(Kress et al., 2016). Num estudo publicado em 1988, foi identificada a existência de aminas biogénicas e de metabolitos em *Daphnia magna* através de HPLC, sendo uma destas aminas, a dopamina (Ehrenström & Berglind, 1988). Concluiu-se também, neste estudo, a existência de vias enzimáticas para a síntese e catabolismo das aminas biogénicas em *D. magna*. Em 2012, Christie e colaboradores realizaram um estudo genómico, no qual compararam genes conhecidos de enzimas biossintéticas de três aminas biogénicas *in silico*, assim como dos seus receptores e transportadores, com genes da *Daphnia magna*. Em relação à amina biogénica dopamina, concluiu-se a existência de três enzimas biossintéticas (tirosina hidroxilase, triptofano-fenilalanina hidroxilase e DOPA descarboxilase), assim como dois receptores (D1R e D2R) e um transportador (DAT). Contudo, em relação às enzimas

biossintéticas, não foram encontrados os domínios funcionais nos seus genes (McCoole, Atkinson, et al., 2012).

A importância da dopamina no movimento e locomoção em *Daphnia* foi já demonstrada. Barrozo e colaboradores estudaram diferentes agonistas e antagonistas dos receptores de dopamina tipo 1 e tipo 2. Verificaram que os agonistas do receptor dopaminérgico tipo 2 inibem a locomoção em *D. magna* (Barrozo et al., 2015). Weiss e colaboradores estudaram a hipótese de a dopamina ter um papel importante na indução de estruturas defensivas quando a *Daphnia* se encontra exposta a um predador. Neste trabalho verificaram a existência de dopamina nas “bulged cells” (células poliploides que se encontram perto do local onde aparecem as defesas morfológicas). Estes autores concluíram que a aplicação de apenas dopamina, resulta num crescimento da *Daphnia*, e sugerem que a dopamina apresenta um papel de agente proliferativo, aumentando a atividade mitótica, e um aumento das células que formam as defesas morfológicas induzidas. Verificaram também que a combinação de acetilcolina e dopamina induz a formação de defesas morfológicas contra os predadores (Weiss, Leese, Laforsch, & Tollrian, 2015).

Alterações na locomoção induzidas por exposição a agonistas dos recetores dopaminérgicos foram também descritas em *D. magna*. Uma exposição mais prolongada a concentrações superiores de apomorfina (agonista de recetor dopaminérgico que ativa recetores do tipo 2) induz uma diminuição na intensidade e na velocidade de locomoção e nos ângulos de viragem. Verificou-se também que não houve alterações fisiológicas (ritmo cardíaco) (A. Bownik, Sokółowska, & Ślaska, 2018).

Recentemente foram identificados neurónios dopaminérgicos no gânglio ótico e no cérebro da *D. magna* através de imunohistoquímica por marcação da tirosina hidroxilase (Figura 7). Neste estudo foi ainda possível verificar que a exposição à neurotoxina beta-metil-amino-L-alanina (BMMA) induz a perda de neurónios dopaminérgicos. (Brooke-Jones, Gálíková, & Dirksen, 2018)

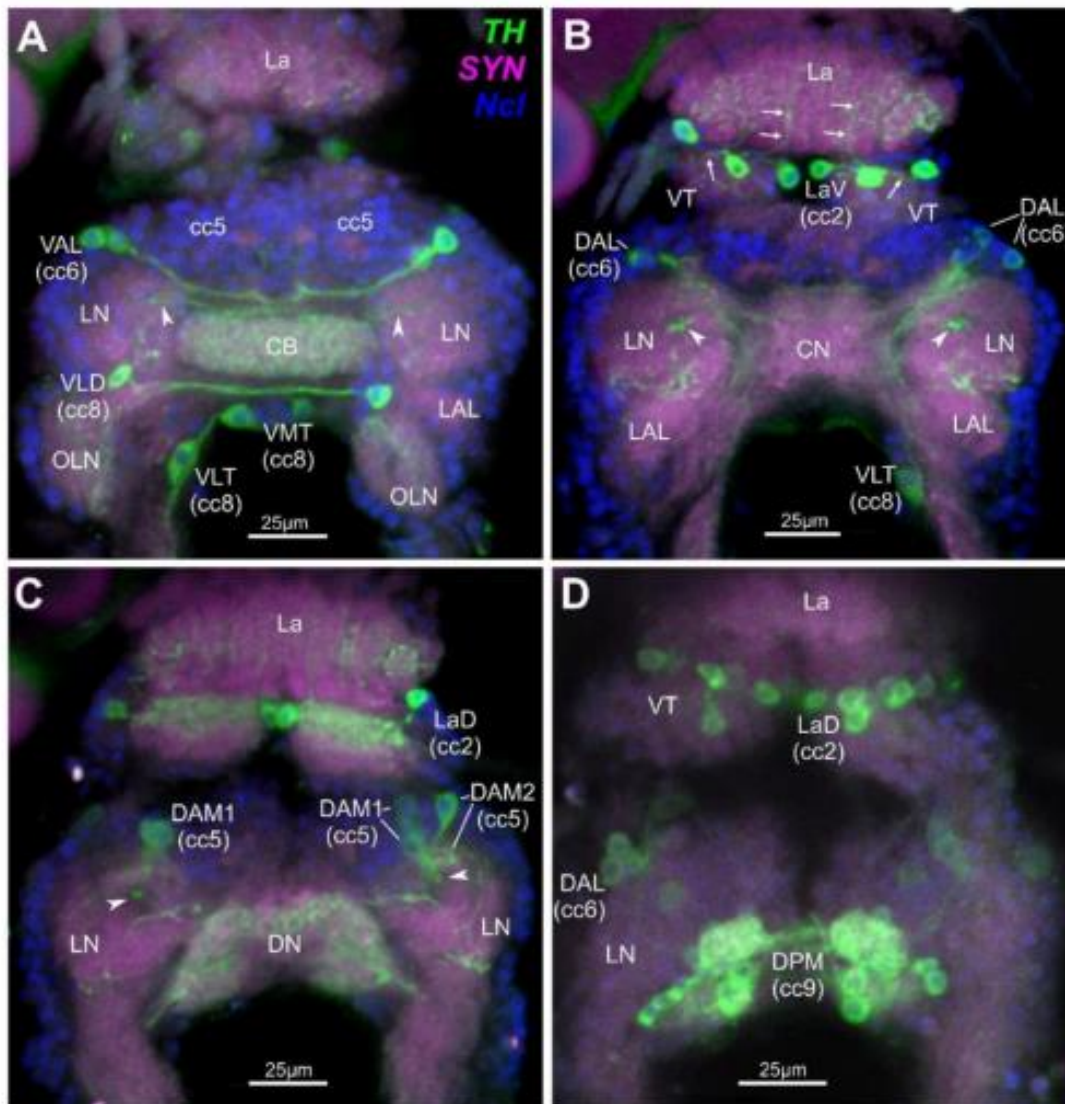


Figura 7: Neurónios dopaminérgicos no gânglio ótico e no cérebro central da *Daphnia magna* revelados por imunohistoquímica de tirosina hidroxilase (TH).

Estas evidências sugerem que a *Daphnia magna* possui as características necessárias para ser um bom modelo animal alternativo para o estudo da doença de Parkinson.

## 2. Objetivo

O principal objetivo desta tese é avaliar o potencial de *Daphnia magna* como modelo alternativo para o estudo da doença de Parkinson. Para tal, foram investigadas as alterações fisiológicas, nomeadamente imobilização, ritmo cardíaco e alterações no movimento deste organismo quando expostas ao neurotóxico de referência paraquato. Secundariamente, pretendeu-se avaliar a adequação do Protocolo 202 da OCDE para esse efeito.

## 3. Métodos

### 3.1. Cultura de *Daphnia magna*

As culturas stock de *Daphnia magna* (Clone K6) foram mantidas a uma temperatura constante de 20°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) com um fotoperíodo de 16h de luz e 8h de escuridão numa câmara de cultura.

Para cada stock, 20 dáfias foram mantidas em copos de 800ml com meio *ASTM Hard water* (Anexo 1), sendo este meio renovado três vezes por semana e com adição de 4,8mg.L<sup>-1</sup> de extrato de alga diluído e filtrado. As culturas foram alimentadas diariamente com alga *Raphidocellis subcapitata*, a uma concentração de 3.0x10<sup>5</sup> células/mL/dáfia. Cada cultura foi mantida até à eclosão da sexta ninhada (N6), e novas culturas foram lançadas com neonatos da terceira à sexta ninhada (N3-N6).

### 3.2. Testes agudos

De acordo com o protocolo da 202 da OECD (OECD/OCDE, 2004), o teste agudo deve ser realizado com neonatos com menos de 24 horas, com um mínimo de 4 réplicas, com cinco dáfias por réplica. As dáfias escolhidas devem ser derivadas de um stock que se encontre saudável (ex. não mostrando sinais de stress, como alta mortalidade, presença de machos e efípias, atraso na produção da primeira ninhada, animais descoloridos, etc). Para cada dáfia, deve ser providenciado no mínimo 2ml, sendo assim necessário colocar no mínimo de 10 ml por poço para as 5 dáfias. O teste agudo é considerado válido quando a imobilização/mortalidade no controlo não exceder os 10%, sendo que estas também não devem apresentar sinais de stress ou de doença.

O teste é realizado a temperatura constante de 20°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) e um fotoperíodo de 16h de luz e 8h de escuridão, durante 48h. Após 24h e 48h de exposição são contabilizadas as dáfias imóveis. Uma dáfia imobilizada é aquela que após uma leve agitação não se move durante 15 segundos. Este teste tem como objetivo obter o EC<sub>50</sub>, i.e., concentração da substância-teste que provoca 50% de efeito, neste caso imobilização.

#### 3.2.1. Teste agudo com tóxico de referência

Por forma a avaliar a condição das dáfias é realizado regularmente um teste de toxicidade aguda com um tóxico de referência. Neste caso, optou-se por seguir a recomendação da norma 202 da OECD, e usar o dicromato de potássio (AnalaR NORMAPUR®, pureza  $\geq 99.8\%$ ). Foram preparadas as seguintes concentrações de dicromato de potássio: 0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; e

3.2mg.L<sup>-1</sup>. O teste foi realizado em quadruplicado em caixas *multi-well* de 6 poços, com 5 neonatos de dáfrias (<24h) em cada poço e a imobilização foi registada após 24h de exposição.

### 3.2.2. Teste agudo - Paraquato

#### 3.2.2.1. Ensaio 1

Para o teste agudo com paraquato (Dicloreto de metil-viologénio hidratado (C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub> · xH<sub>2</sub>O), SIGMA-ALDRICH, pureza=98%) foram realizados diversos testes com diferentes concentrações. Numa primeira fase, foram realizados testes com concentrações de 0, 2,5; 5; 10; 20 e 40 mg.L<sup>-1</sup>. As soluções de paraquato foram preparadas no dia do teste, preparando primeiro uma solução stock em *ASTM Hard water* de 80mg.L<sup>-1</sup> e de seguido preparando as restantes concentrações através de diluições sucessivas. Este teste foi realizado com 5 réplicas e em cada poço foram colocados cinco neonatos de *Daphnia magna* com menos de 24h.

#### 3.2.2.2. Ensaio 2

Numa segunda fase, foram realizados ensaios com concentrações diferentes, sendo estas 0, 4, 8, 12, 16 e 20 mg.L<sup>-1</sup>. As soluções foram preparadas no próprio dia por diluições sucessivas a partir de uma solução stock de 20 mg.L<sup>-1</sup>. Todo o material de plástico foi descartado (Contentor resíduos hospitalares - Grupo IV) e o material de vidro foi lavado com etanol e depois por água. Após 24 h e 48h de exposição foi registada a imobilização e registadas o movimento das dáfrias.

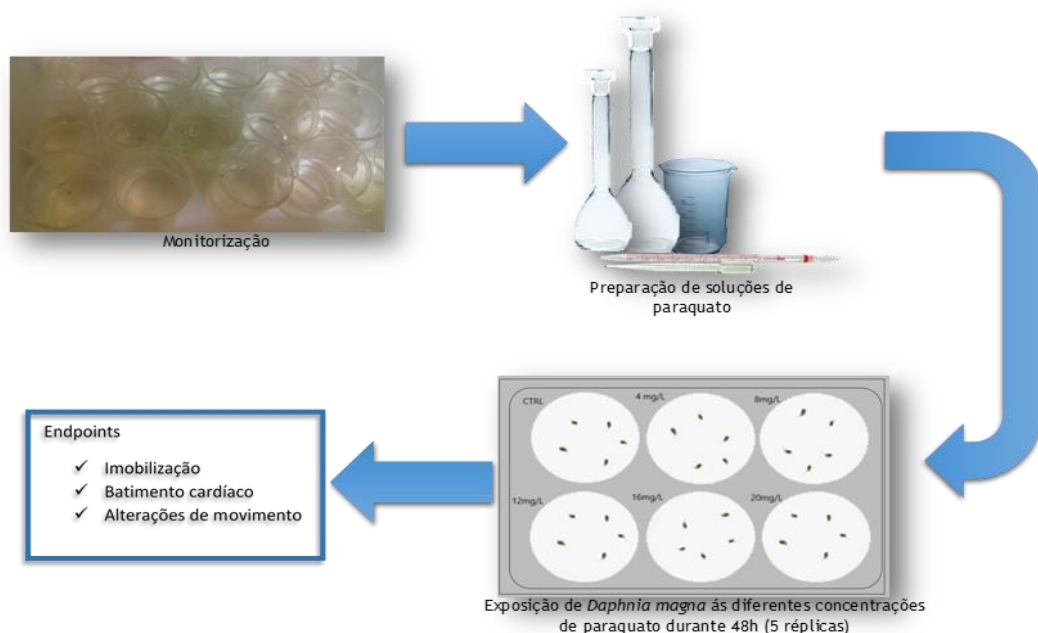


Figura 8: Esquema representativo dos ensaios realizados.

### **3.2.2.3. Ensaio 3**

Numa terceira fase, foram realizados testes agudos com dáfnias com diferentes tempos de vida. Para isso, as dáfnias foram individualizadas em copos de 100ml e foi monitorizada de hora a hora até à eclosão dos neonatos. Foram então realizados os testes agudos com dáfnias de diferentes “idades” (2h, 4h, 8h, 12h, 16h, 20h e 24h). Após as 24h de exposição, foi registada a imobilização e após as 48h, foi registada a imobilização, o movimento e o batimento cardíaco das dáfnias.

### **3.3. Batimento cardíaco**

Para a contagem do batimento cardíaco, foi necessário registar o batimento em vídeo. Para tal, foi utilizada a lupa Nikon SMZ 745T Model C-LEDS. Para a filmagem do batimento cardíaco, as dáfnias foram filmadas individualmente, assim, a dáfnia a ser filmada foi colocada numa placa de onde foi retirado todo o meio de cultura possível. De seguida, a dáfnia foi colocada sob a iluminação da lupa e a imagem foi transmitida para computador pelo software IC Capture 2.4. As condições para gravar o batimento cardíaco foram otimizadas (RG24(960x480), FPS 52.37), numa ampliação 5x. Com as condições otimizadas, foram realizados vídeos de 10 segundos focando a zona do coração da dáfnia.

### **3.4. Alterações do movimento**

A alterações do movimento foram registadas em vídeo diretamente nos poços em que decorreram os testes agudos. Para a realização destes vídeos, foi utilizada uma webcam ELECOM (UCAM-DLA200H series, f:4.3mm-∞, F/#1.8), e respetivo software para ligação direta ao computador. Os vídeos foram gravados no computador com o software Flashback Express Recorder. As placas foram colocadas sobre a placa de iluminação da lupa Nikon SMZ 745T Model C-LEDS, de modo a ter iluminação necessária para a obtenção de uma imagem nítida. De seguida, a webcâmara é posicionada e focada de modo a obter-se uma imagem nítida do poço que se pretende filmar. O programa Flashback Express Recorder é otimizado de maneira a apenas ser filmado a imagem transmitida pela webcam. Após todas as otimizações, os vídeos com duração de 15 segundos foram gravados.



Figura 9: Imagem demonstrativa das filmagens efetuadas para registar o movimento dos organismos teste.

Os vídeos foram carregados no software Traker V5.1.3, o que permitiu, após calibração (usando como referência o diâmetro do poço da placa de teste), a determinação o comprimento total e da amplitude (em milímetros) dos movimentos de cada um dos organismos de teste individualmente.

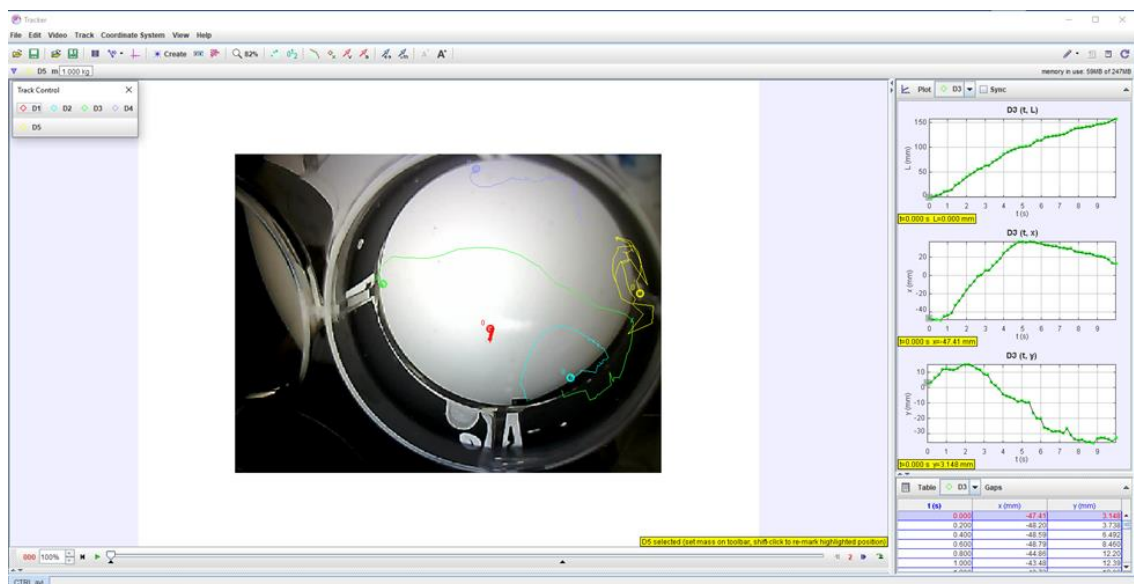


Figura 8: Impressão de ecrã do aspeto gráfico do software Traker. Este exemplo apresenta, na imagem central, os trajetos de todos os organismos do Controlo com a idade de 20h. Os gráficos reportam à deslocação total e amplitude de movimentos (relativa a um eixo ortogonal arbitrariamente estabelecido no centro da imagem) do organismo número 3 (D3), cujo trajeto está representado a verde na imagem.

## 4. Resultados

### 4.1. Teste agudo com dicromato de potássio

O teste de toxicidade aguda com dicromato de potássio foi realizado em outubro de 2019. Os resultados obtidos demonstram que as dáfnias se encontravam em boas condições, com valores de  $EC_{50}$  dentro do intervalo entre  $0,6\text{mg.L}^{-1}$  -  $2,1\text{mg.L}^{-1}$  proposto pela OECD/OCDE (2004).

Tabela 1: Resultados obtidos no teste agudo com dicromato de potássio

Data	Ninhada	$EC_{50}$ (mg.L <sup>-1</sup> )
06.10.2019	N2	$1,71 \pm 1,2048 \times 10^{-9}$
Valor de referência		0,6 - 2,1

### 4.2. Testes agudos com Paraquato - Imobilização

Numa primeira fase foram realizados testes agudos com concentrações crescentes de paraquato por forma a determinar o  $EC_{50}$ . Estes testes foram realizados seguindo as recomendações da OCDE (ie. com neonatos com idade inferior a 24h provenientes de ninhadas entre a N2 a N5). Para garantir a reprodutibilidade dos nossos resultados foram realizados vários ensaios de toxicidade aguda com diferentes concentrações de paraquato. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 2 e Figura 12.

Tabela 2: Resultados de  $EC_{50}$  às 48h para os ensaios 1 e 2, obtidos com neonatos com idade inferior a 24h.

Data	$EC_{50}$ (mg.L <sup>-1</sup> )	Ninhada
10.03.2019	$10,13 \pm 1,357$	N4
02.04.2019	$13,44 \pm 0,549$	N3
23.04.2019	$10,68 \pm 0,703$	N5
02.05.2019	$16,32 \pm 0,837$	N3
02.05.2019	$12,81 \pm 0,534$	N3
08.05.2019	$8,39 \pm 2,268$	N5
08.05.2019	$8,97 \pm 1,618$	N5
15.05.2019	$12,74 \pm 1,594$	N3
21.05.2019	$6,39 \pm 0,043$	N5
02.06.2019	$13,46 \pm 0,593$	N2
04.06.2019	$6,95 \pm 1,325$	N3
10.06.2019	$3,96 \pm 9,30 \times 10^{-11}$	N4
13.06.2019	$10,22 \pm 0,134$	N5

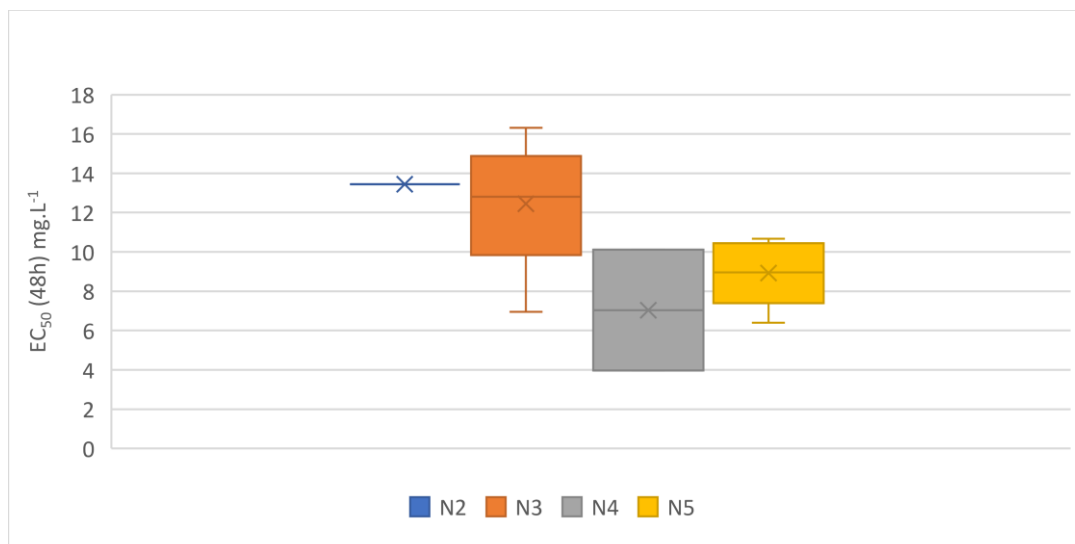


Figura 9: Gráfico representativo dos EC<sub>50</sub> obtidos em função das diferentes ninhadas utilizadas nos testes.

Tal como se pode verificar, existe uma grande variabilidade nos valores de EC<sub>50</sub> obtidos. Perante estes resultados, tornou-se evidente que seria necessário otimizar e uniformizar as condições experimentais. Assim foram realizados novos ensaios em que se utilizaram dáfias com a mesma idade, tal como descrito na seção 3.2.2.3. Na tabela 3 e figuras 13 e 14 encontram-se os resultados obtidos.

Tabela 3: Valores de EC<sub>50</sub> obtidos para neonatos com diferentes idades, com indicação da ninhada usada (N) e do número médio de neonatos por ninhada (N<sup>o</sup> neo).

N	N <sup>o</sup> neo	Data	Hora de nascimento	Idade	Ec <sub>50</sub> (24h) (mg.L <sup>-1</sup> )	Ec <sub>50</sub> (48h) (mg.L <sup>-1</sup> )
N4	58	07.08.2019	11h30	2h	Sem mortalidade	3,73±8,26 ×10 <sup>-10</sup>
N6	60	16.08.2019	16h30	2h	16,27±7,137×10 <sup>-10</sup>	3,07±7,13 ×10 <sup>-10</sup>
N3	49	02.09.2019	9h40	3h	38,29±0,274	4,27±1,65 ×10 <sup>-9</sup>
N4	66	04.09.2019	10h40	4h	17,04±0,147	5,98±1,51 ×10 <sup>-12</sup>
N6	61	11.09.2019	14h00	8h	16,03±5,2×10 <sup>-11</sup>	7,41±0,149
N3	30	08.10.2019	14h00	12h	18,8±0,58	9,94±1,37 ×10 <sup>-12</sup>
N3	30	08.10.2019	16h00	16h	19,19±4,48×10 <sup>-11</sup>	8,23±2,04 ×10 <sup>-9</sup>
N3	49	02.09.2019	9h40	20h	a	9,03±1,15
N4	37	08.10.2019	17h30	20h	16,29±1,27 ×10 <sup>-9</sup>	7,57±1,27×10 <sup>-09</sup>
N5	39	14.10.2019	17h45	20h	a	b
N6	61	12.09.2019	11h00	24h	12,11±1,732	14,32±0,266
N5	74	17.09.2019	13h15	24h	Sem mortalidade	13,60±1,141
N4	37	11.10.2019	14h00	24h	19,22±9,58 ×10 <sup>-12</sup>	10,2±1,018

a- Sem mortalidade

b- Mortalidade total no controlo

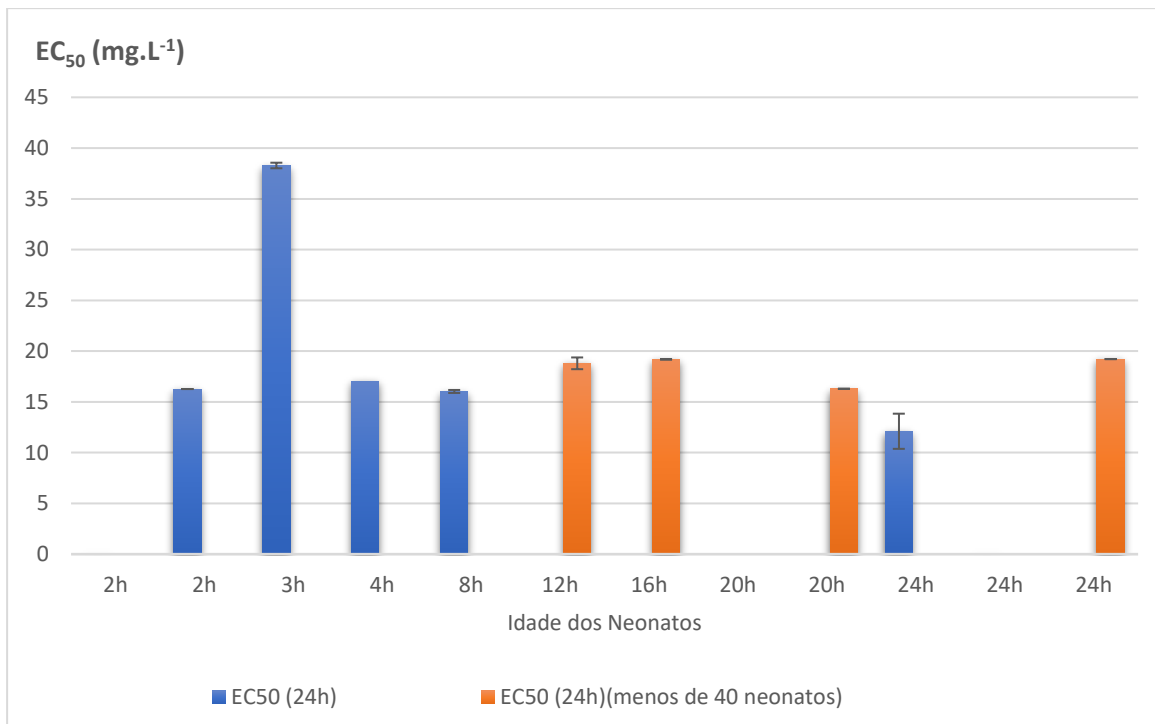


Figura 12: Gráfico representativo dos resultados do EC<sub>50</sub> à 24h em testes agudos em que são utilizados neonatos com diferentes idades. Os resultados de neonatos provenientes de dáfias saudáveis estão assinalados a azul e a laranja estão assinalados os resultados obtidos com neonatos provenientes de dáfias com menor sucesso reprodutivo (<40 neonatos/ninhada).

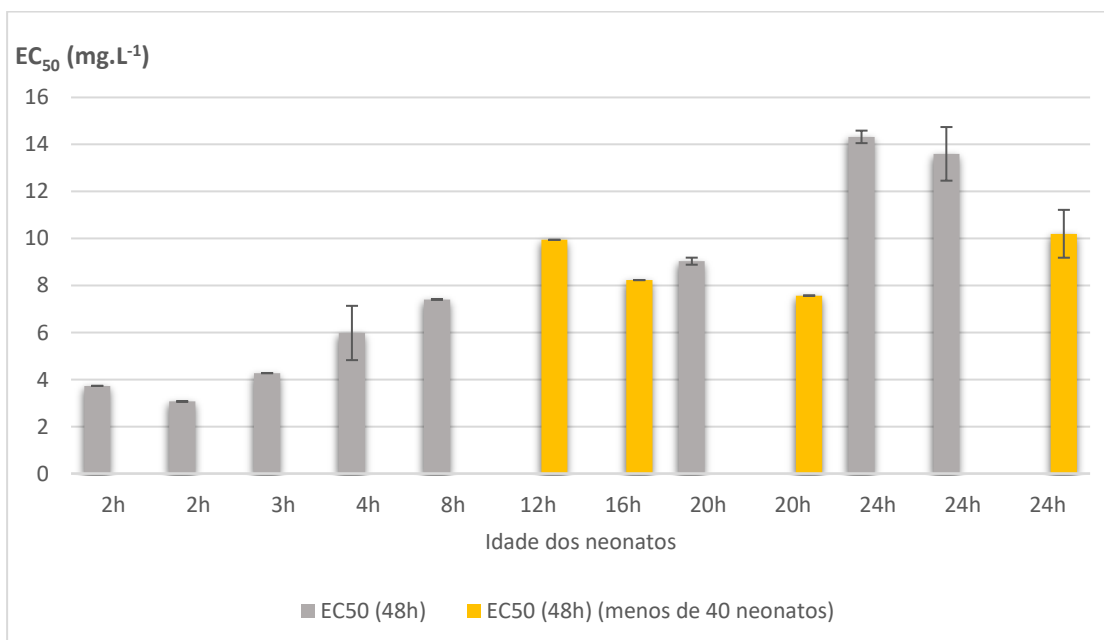


Figura 10: Gráfico representativo dos resultados do EC<sub>50</sub> às 48h em testes agudos em que são utilizados neonatos com diferentes idades. Os resultados de neonatos provenientes de dáfias saudáveis estão assinalados a cinzento e a amarelo estão assinalados os resultados obtidos com neonatos provenientes de dáfias com menor sucesso reprodutivo (<40 neonatos/ninhada).

A partir destes resultados, podemos observar que existe relação entre os valores do  $EC_{50}$  às 48h e a idade dos neonatos utilizados. Quanto maior for a idade dos neonatos utilizados, maior foi o seu valor de  $EC_{50}$  às 48h (Gráfico 13). Contudo, a 20.09.2019 a cultura de dáfnias foi afetada por contaminação. Esta contaminação causou diversos problemas a nível do *fitness* das dáfnias, como por exemplo a diminuição do número de neonatos por progenitora. Esta contaminação também alterou as tendências dos resultados do  $EC_{50}$  às 48h. Os valores de  $EC_{50}$  às 48h com neonatos com 20h e 24h provenientes de dáfnias cujo nº médio de neonatos foi inferior a 40 (assinalado a amarelo no gráfico 13) diminuíram em relação aos testes realizados com neonatos provenientes de ninhadas com mais de 40 neonatos por fêmea (assinalados a cinzento no gráfico 13), antes da existência da contaminação. Além disso, o  $EC_{50}$  às 48h diminuiu quanto maior for a idade dos neonatos utilizados nos testes, exceto para o teste das 24h, que continua a ter o valor mais elevado de  $EC_{50}$  em relação aos outros testes com neonatos de menor idade. Em relação às 24h (Gráfico 12), o  $EC_{50}$  não possui grande variabilidade entre os testes realizados.

Após estes resultados, foram realizados mais testes de modo a que a única variável fosse a idade das dáfnias. Na impossibilidade de realizar todos com a mesma ninhada, os testes foram realizados com duas ninhadas próximas uma da outra (N3 e N4), com neonatos em que as progenitoras se encontrassem melhor de saúde (neonatos em que a respetiva progenitora tivesse dado 40 ou mais neonatos). Na figura 15 encontram-se as percentagens de imobilização obtidas em função das diferentes concentrações testadas para os neonatos com 2h, 4h, 8h, 12h, 16h, 20h e 24h. Da análise da figura é possível observar que de uma forma global a percentagem de imobilização às 48h vai tendendo a diminuir quanto maior a idade das dáfnias, havendo algumas exceções (um aumento ligeiro entre dáfnias com 4h e 8h, e um aumento de taxa de imobilização entre as 20h e as 24h). Em relação às 24h, de uma forma geral, a percentagem de imobilização aumenta entre os testes das 2h e os testes das 12h, diminuindo entre as 12h e 24h. Os valores de  $EC_{50}$  obtidos encontram-se sumariados na Tabela 4 e na figura 16.

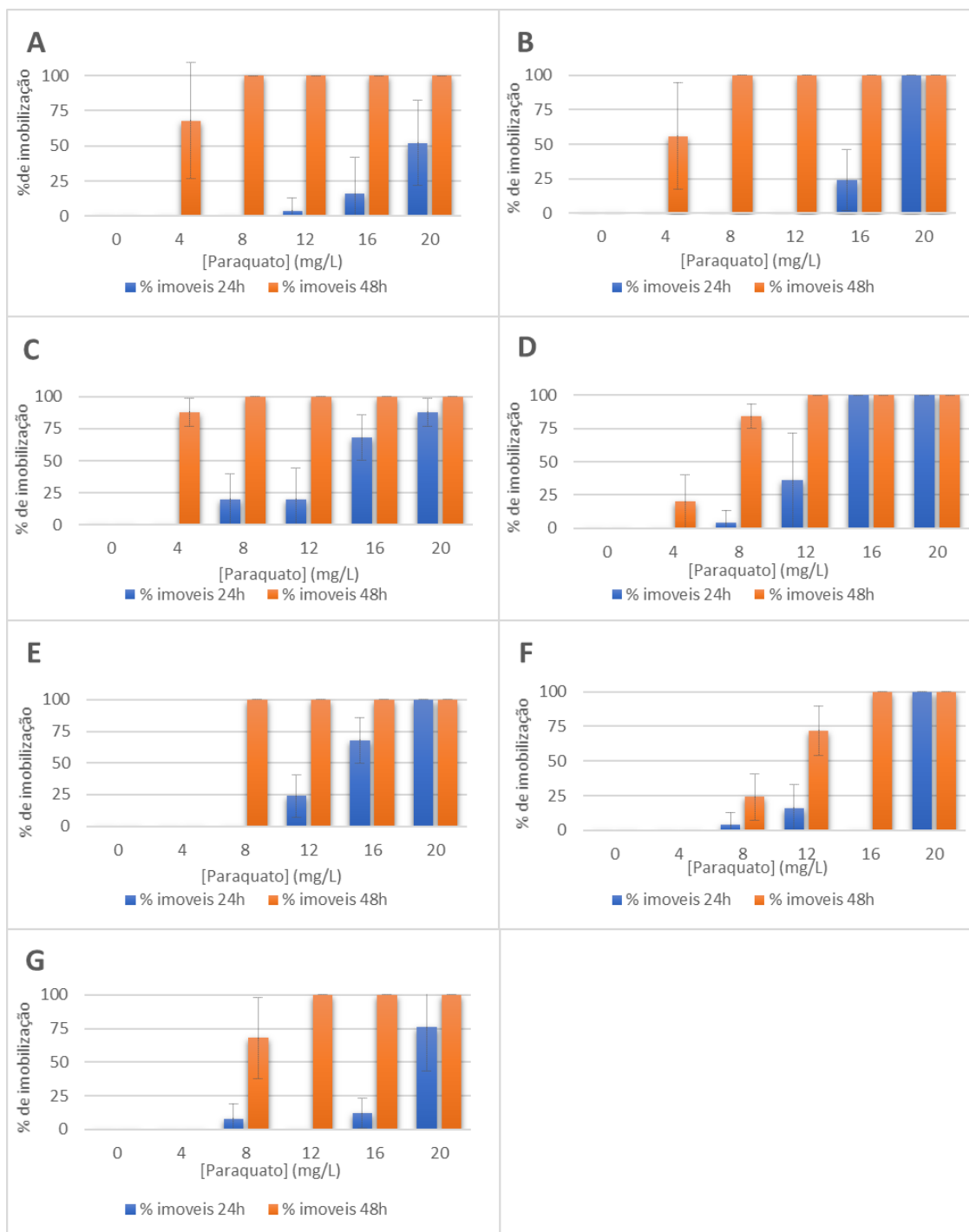


Figura 14: Gráficos representativos da imobilização da *Daphnia magna* quando em contacto com as diferentes concentrações de paraquato: A - neonatos com 2h; B-neonatos com 4h; C-neonatos com 8h; D-neonatos com 12h; E- neonatos com 16h; F- neonatos com 20h; G- neonatos com 24h.

Tabela 4: Resultados obtidos de EC<sub>50</sub> às 24h e às 48h dos testes realizados com neonatos com diferentes idades (N-ninhada)

N	Média nº neonatos	Data	Hora do nascimento	Idade (h)	EC <sub>50</sub> (24h) (mg.L <sup>-1</sup> )	EC <sub>50</sub> (48h) (mg.L <sup>-1</sup> )
N3	40,66	10.11.2019	14h30	2h	19,83±0,120	3,88±3,27×10 <sup>-10</sup>
N3	48,66	10.11.2019	11h45	4h	16,21±1,32×10 <sup>-9</sup>	3,96± 9,31×10 <sup>-11</sup>
N3	45,33	10.11.2019	14h30	8h	15,23±2,20	3,69±8,60×10 <sup>-10</sup>
N4	46,36	13.11.2019	13h30	12h	12,53±0,53	5,83±0,199
N4	46	13.11.2019	20h30	16h	14,83±0,65	5,98±1,51×10 <sup>-12</sup>
N4	41	13.11.2019	15h00	20h	18,91±2,38	10,46±0,49
N4	44,6	13.11.2019	14h30	24h	27,97±1,15	7,88±5,83×10 <sup>-10</sup>

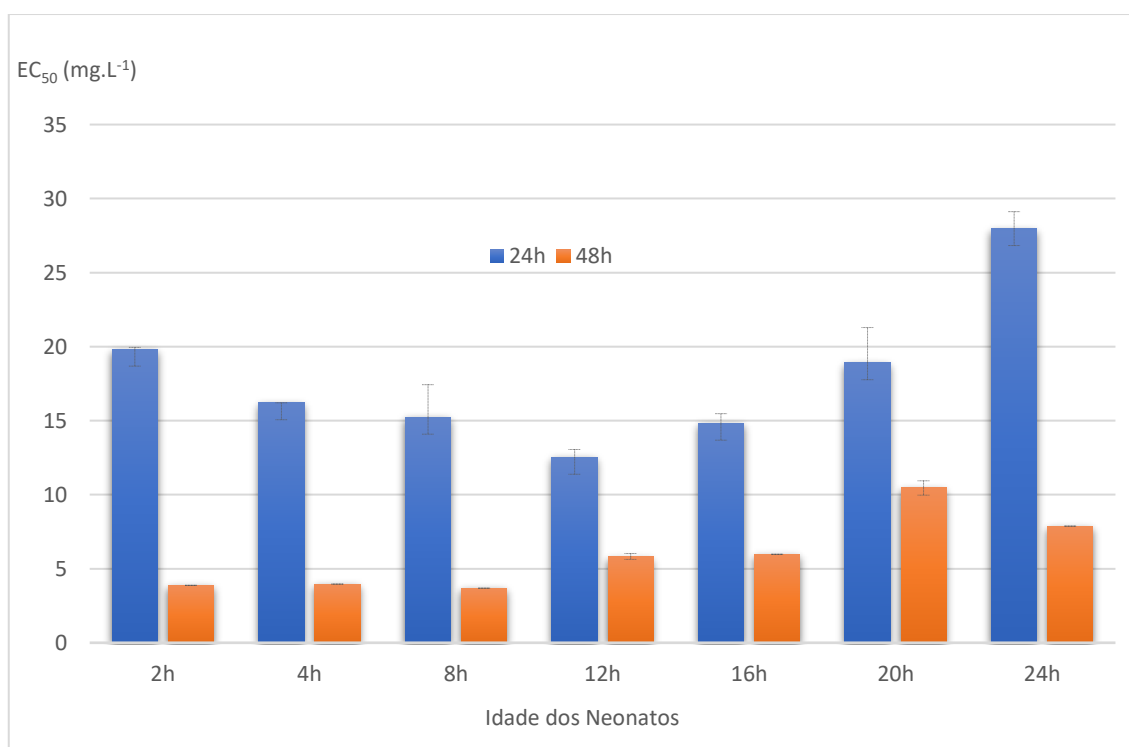


Figura 15: Gráfico representativo dos resultados de EC<sub>50</sub> às 24h e 48h para os neonatos com as diferentes idades testadas.

Da análise da figura 16, podemos verificar que os valores de EC<sub>50</sub> nos testes realizados com neonatos com idades entre as 2h e as 20h variam entre 12,53 e 19,83 mg.L<sup>-1</sup>, sendo que às 24h o valor aumenta para 27,97 mg.L<sup>-1</sup>. Em relação às 48h, os testes realizados com neonatos com 2h, 4h e 8h possuem um EC<sub>50</sub> muito semelhante (3,88; 3,96 e 3,69 mg.L<sup>-1</sup>, respetivamente). Entre o teste com neonatos com 8 horas e o teste com neonatos com 12h, há um aumento do valor do EC<sub>50</sub>, sendo que este último teste difere muito pouco do teste com neonatos com 16h. Entre o teste das 16h e os das 20h, o valor de EC<sub>50</sub> aumenta para quase o dobro, sendo que entre o teste das 20h e o teste das 24h, existe uma diminuição do valor de EC<sub>50</sub>.

De uma forma geral, estes resultados demonstram que o valor de  $EC_{50}$  é dependente da idade dos neonatos utilizados para os testes.

### 4.3. Testes agudos com Paraquato - Batimento cardíaco

Para a obtenção do batimento cardíaco, foi filmado o batimento cardíaco de todas as dáfias vivas dos testes. Na figura 17 encontra-se o gráfico ilustrativo do número de dáfias vivas dos testes realizados em novembro (Ensaio 3).

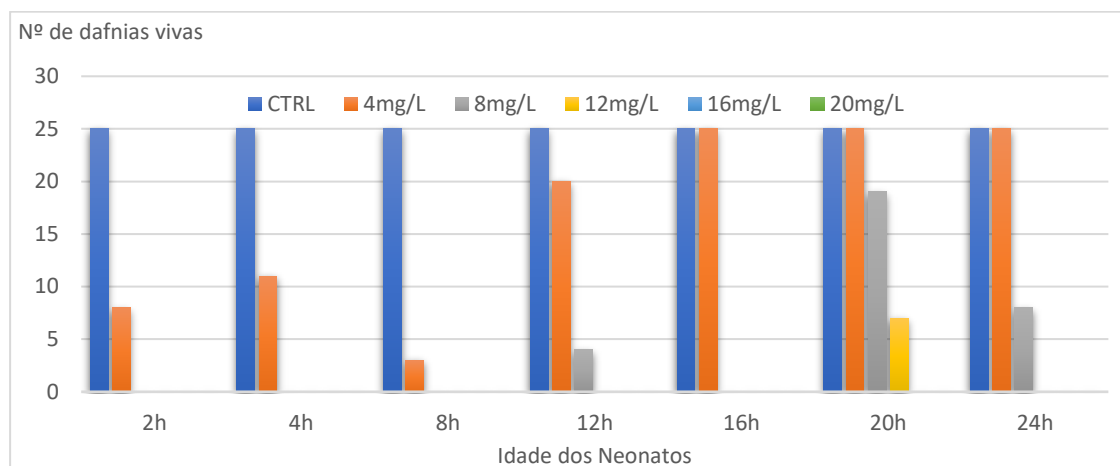


Figura 116: Gráfico representativo do número de dáfias vivas (às 48h) por concentração em função da idade. O nº total de animais por concentração foi de 25.

Após a realização dos vídeos, foram registados o número de batimentos cardíacos. Os valores apresentados na tabela 5 e na figura 18 dizem respeito à média dos valores obtidos para todas as dáfias vivas e respetivos desvios.

Tabela 5: Número de batimentos cardíacos por minuto nos diferentes testes agudos para cada concentração.

Idade	Batimento cardíaco (Nº de batimentos/ min)			
	Ctr	4 mg.L <sup>-1</sup>	8 mg.L <sup>-1</sup>	12 mg.L <sup>-1</sup>
2h	383,2±17,685	265,67±15,326		
4h	423,04±10,383	221,6±66,297		
8h	370,48±150,641	286±39,732		
12h	434±21,840	306,32±54,183	154±24,167	
16h	443,28±14,800	218,75±23,751		
20h	413,92±14,531	302,28±20,412	167,08±71,414	172,25±18,660
24h	472,16±11,718	320,36±42,77	186±23,622	

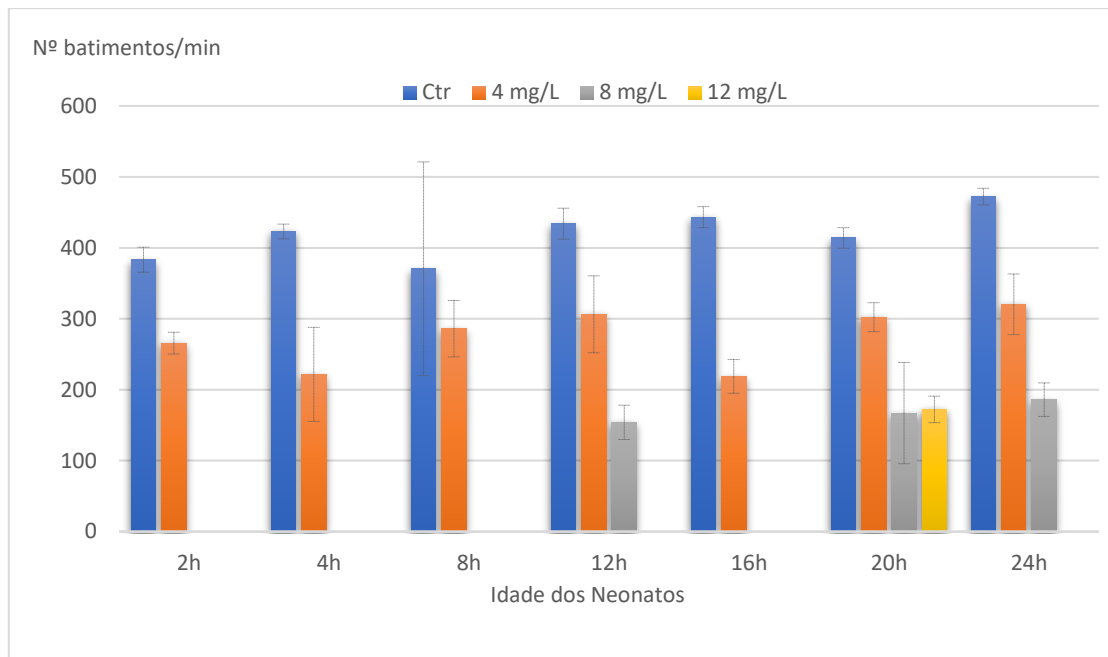


Figura 17: Número médio de batimentos cardíacos por concentração em cada teste realizado.

A figura 17 demonstra que quanto maior a concentração de paraquato, menor é o batimento cardíaco das dáfnias. De uma forma geral, os valores do controlo são muito similares para cada teste realizado, variando entre 370 e 472 batimentos/minuto. Para a concentração de 4mg.L<sup>-1</sup>, os valores do batimento cardíaco variaram entre 218 e 320, tendo o valor mais baixo sido registado nas dáfnias com 4h. Para a concentração de 8mg.L<sup>-1</sup>, o ritmo cardíaco aumenta ligeiramente com a idade. Para a concentração de 12mg.L<sup>-1</sup>, não existe termo de comparação, uma vez que apenas um dos testes apresenta dáfnias vivas nesta concentração.

#### 4.4. Testes agudo com Paraquato - Movimento

As alterações de movimento foram registadas em vídeos de 15 segundos e depois analisadas através do software *Traker V5.1.3*.

No entanto, devido à mortalidade generalizada nos tratamentos com concentrações de paraquato acima de 4 mg.L<sup>-1</sup>, só foi possível realizar comparações nesta concentração entre os estágios etários testados.

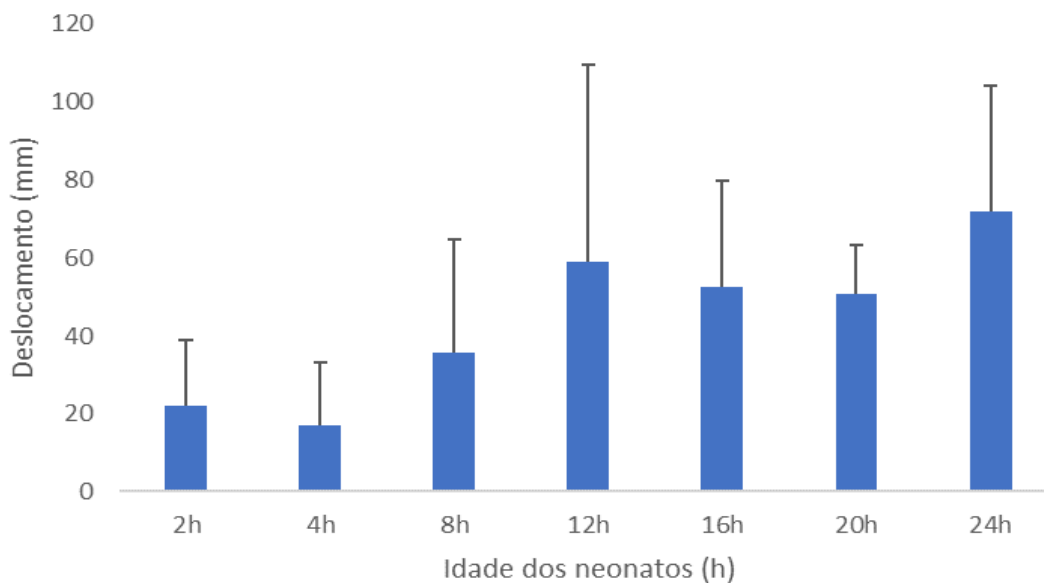


Figura 128: Resultados do deslocamento registado por *Daphnia magna* com 2, 4, 8, 12, 16, 20 e 24 horas de vida sujeita a uma concentração de 4 mg.L<sup>-1</sup> de paraquato durante 48h.

Como podemos observar na figura 18, o deslocamento da *Daphnia magna* quando em contacto com o paraquato tem tendência a aumentar quanto maior for a idade da *Daphnia* (com ligeiras exceções entre as 2h e as 4h e as 12h e 16h, se entre as 16h e 20h).

A realização do teste estatístico de Kruskal-Wallis de uma via determinou que as diferenças nos valores médios dos diferentes grupos não eram suficientemente pronunciadas para excluir a possibilidade de que a diferença de deslocamento se deva a variabilidade de amostragem, concluindo-se assim que não existe uma diferença estatisticamente significativa ( $P = 0.054$ ).

O registo das diferenças de deslocação para organismos com 20h de vida colocados nas três concentrações teste (4, 8 e 12 mg.L<sup>-1</sup>) foi também realizado.

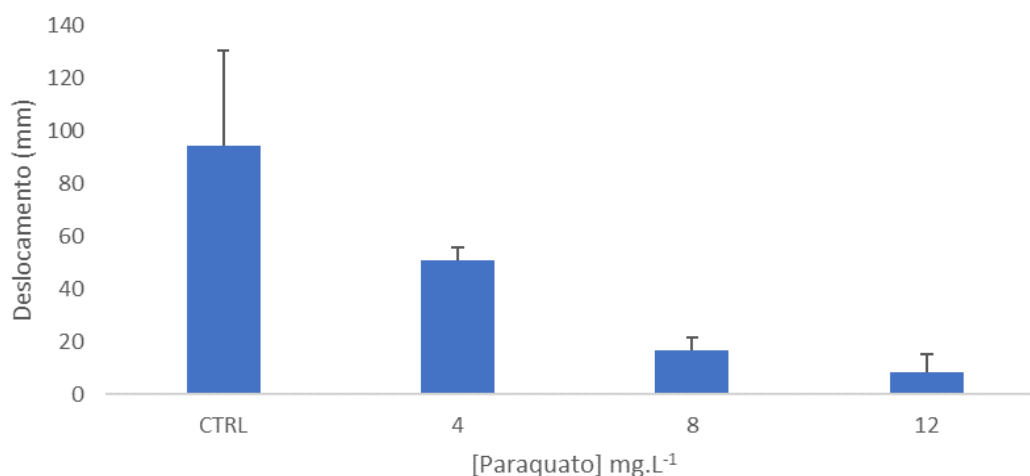


Figura 13: Resultados do deslocamento registado por *Daphnia magna* com 20 horas de vida quando sujeita a concentrações de 4, 8 e 12 mg.L<sup>-1</sup> de paraquato durante 48h.

Como podemos observar pela figura 19, o deslocamento das dáfnias diminui consoante o aumento da concentração de paraquato existente no meio.

A aplicação aos dados obtidos de ANOVA de uma via, seguida do teste post-hoc de Student-Newman-Keuls, demonstrou que existem diferenças estatisticamente significativas entre todos os tratamentos com a exceção das concentrações de 8 e 12 mg.L<sup>-1</sup>.

## 5. Discussão

Para comparação, foi feita uma revisão da literatura onde foram realizados testes agudos com neonatos (<24h) de *Daphnia*. A pesquisa foi feita no Scopus, PubMed e ScienceDirect, em que as palavras-chaves foram *paraquat* AND *Daphnia*. Foram obtidos diversos artigos, mas apenas quatro artigos apresentavam resultados de testes agudos com neonatos. Os resultados apresentados nos artigos encontram-se descritos na tabela 6.

Tabela 6: Valores de EC<sub>50</sub> descritos na literatura obtidos em testes agudos com neonatos de *Daphnia magna* após exposição a paraquato.

Referência	Toxicant	EC <sub>50</sub> (24h) mg.L <sup>-1</sup>	EC <sub>50</sub> (48h) mg.L <sup>-1</sup>
(Rainville, Coelho, & Sheehan, 2015)	Paraquato		22,58
(Ikuno, Matsumoto, Okubo, Itoi, & Sugita, 2008)	Paraquato		9,58 ± 3,54
(S. Y. Park & Choi, 2007)	Dicloreto de Paraquato	1126	
(Alberdi, Sàenz, Di Marzio, & Tortorelli, 1996)	Paraquato	16,47	4,55
(Crosby & Tucker, 1966)	Paraquato	11,00	
(Gerhardt, 2011)	Paraquato		6,1
(Kim et al., 2009)	Dicloreto de Paraquato		6.39
European Commission, 2003	Paraquato		4,4
FAO	lão Paraquato	16,29	6,08
Este estudo		12,11 - 38,29	3,07 - 16,32

Os resultados obtidos de EC<sub>50</sub> são muito diferentes entre estudos. Os valores às 48h variam entre 4,4 e 22,58 mg.L<sup>-1</sup>, enquanto que às 24h a variação de valores é muito mais elevada (entre os 11 e os 1126mg.L<sup>-1</sup>).

Esta diferença nos resultados entre os diferentes estudos publicados é também notória nos ensaios realizados na presente tese em que foram obtidos valores de EC<sub>50</sub> para as 48h entre 3,07 e 16,32 mg.L<sup>-1</sup>. Para tentar perceber a falta de reprodutibilidade obtida nos primeiros testes, todas as condições foram otimizadas e foi possível verificar que esta variação está associada à diferença de idades dos neonatos usados. Assim, numa fase posterior da tese, foram realizados testes agudos com neonatos com diferentes idades. Foi constatado que, regra geral, o EC<sub>50</sub> às 48h aumenta com a idade dos neonatos. Assim sendo supomos que também nos diferentes artigos publicados, as idades dos neonatos nos diferentes trabalhos já publicados também serão diferentes entre si.

Assim é necessário fazer um ajuste no protocolo proposto pela OCDE, em que a idade dos neonatos terá que ser estipulada num intervalo de tempo mais curto ao que é proposto pela OCDE.

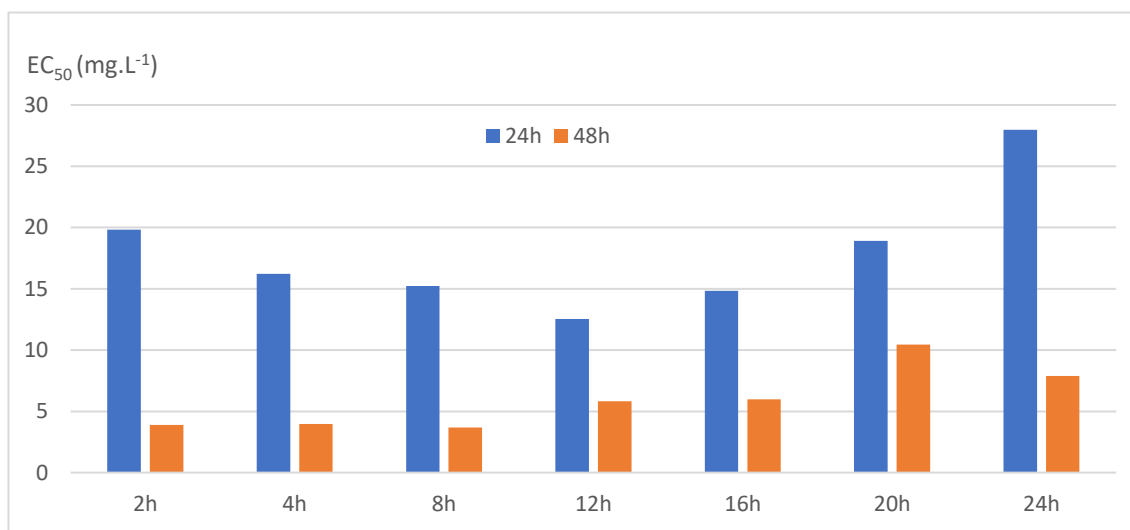


Figura 140: Gráfico representativo da variação de EC<sub>50</sub> em função da idade dos neonatos utilizados nos testes agudos.

No que diz respeito ao ritmo cardíaco, foi demonstrado que o batimento cardíaco diminui com o aumento da concentração de paraquato. Também se verificou que o controlo não demonstrou uma diferença significativa entre os neonatos com diferentes idades. Já nas restantes concentrações, demonstrou-se que quanto maior for a idade, maior será o seu batimento cardíaco.

Tabela 7: Conclusões de batimento cardíaco quando o organismo *Daphnia* encontra-se exposta a diferentes pesticidas descritos na literatura.

Referência	Pesticida	Espécie	Batimento cardíaco
(Friberg-Jensen, Nachman, & Christoffersen, 2010)	Cipermetrina	<i>Daphnia magna</i>	Diminui quanto maior a concentração
	Azoxistrobina	<i>Daphnia magna</i>	Diminui quanto maior a concentração
(Adam Bownik, Kowalczyk, & Bańcerowski, 2019)	λ-cihalotrina	<i>Daphnia magna</i>	Diminui quanto maior a concentração
(Adam Bownik, Pawłocik, & Sokółowska, 2017)	Acetamiprida	<i>Daphnia magna</i>	Diminui quanto maior a concentração

Quando comparado com as conclusões presentes na tabela 7, podemos verificar que o paraquato segue a tendência dos pesticidas descritos na literatura, ou seja, quanto maior a concentração do pesticida presente no meio, menor será o batimento cardíaco da *Daphnia magna*

Relativamente às alterações de movimento, verificou-se um aumento do deslocamento para a mesma concentração de paraquato quanto maior for a idade dos neonatos. Verificou-se também uma diminuição de deslocamento para a mesma idade de neonatos quanto maior for a concentração de paraquato no meio.

Tabela 8: Alterações de movimento em *Daphnia* com diferentes substâncias descritos na literatura.

Referência	Substância	Espécie	Alteração de movimento
(Adam Bownik & Pawlik-Skowrońska, 2019)	Anatoxina-a	<i>Daphnia magna</i>	Diminuição do deslocamento com o aumento da concentração
(Adam Bownik et al., 2019)	$\lambda$ -cihalotrina	<i>Daphnia magna</i>	Diminuição do deslocamento com aumento da concentração
(Zein, McElmurry, Kashian, Savolainen, & Pitts, 2014)	Clorpirifos	<i>Daphnia pulex</i>	Diminuição do deslocamento quanto maior a concentração
(Hansen & Roslev, 2016)	Mistura de glifosato e cobre	<i>Daphnia magna</i>	Diminuição do deslocamento quanto maior a concentração

Em comparação com a literatura descrita na tabela anterior, podemos verificar que o paraquato segue a tendência de outros compostos já descritos, ou seja, a diminuição do deslocamento quanto maior for a concentração do paraquato no meio.

## 6. Conclusão

O objetivo desta dissertação consistiu em estudar a possibilidade de a *Daphnia magna* ser um bom modelo animal alternativo para o estudo da doença de Parkinson. Para este efeito, neonatos de *D. magna* foram expostos a um neurotóxico de referência, o herbicida paraquato, que é usado com sucesso para induzir a doença de Parkinson em roedores.

Após a realização de testes agudos, foi notória uma falta de reprodutibilidade, falta de reprodutibilidade essa que foi atribuída à idade dos neonatos utilizados nos testes.

Assim, sugerimos uma otimização no protocolo proposto pela OCDE, em que o intervalo da idade dos neonatos utilizados deve ser controlado.

De uma forma geral, pudemos verificar que a *Daphnia magna* é muito sensível a este herbicida, sendo que o parâmetro idade dos neonatos é um dos parâmetros que tem influência no  $EC_{50}$  obtido nos testes. Por outro lado, os valores de ritmo cardíaco diminuem quanto maior for a quantidade de paraquato presente no meio e aumenta com a idade das dáfnias. Quanto às alterações de movimento, o deslocamento aumenta quanto maior for a idade dos neonatos para a mesma concentração e diminui quanto maior for a concentração para neonatos com a mesma idade.

Os resultados obtidos na presente tese são bastante promissores e devem ser considerados como um bom ponto de partida para uma futura validação do modelo *Daphnia magna* no estudo da doença de Parkinson.

## Referências Bibliográficas

- Aggarwal, A., Reichert, H., & VijayRaghavan, K. (2019). A locomotor assay reveals deficits in heterozygous Parkinson's disease model and proprioceptive mutants in adult *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(49), 24830-24839. doi:10.1073/pnas.1807456116
- Alberdi, J. L., Sàenz, M. E., Di Marzio, W. D., & Tortorelli, M. C. (1996). Comparative acute toxicity of two herbicides, paraquat and glyphosate, to *Daphnia magna* and *D. spinulata*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 57(2), 229-235. doi:10.1007/s001289900180
- Alexander, G. E., & Crutcher, M. D. (1990). Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in Neurosciences*, 13(7), 266-271. doi:https://doi.org/10.1016/0166-2236(90)90107-L
- Barrozo, E. R., Fowler, D. A., & Beckman, M. L. (2015). Exposure to D2-like dopamine receptor agonists inhibits swimming in *Daphnia magna*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 137, 101-109. doi:https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.08.010
- Bové, J., & Perier, C. (2012). Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 211, 51-76. doi:https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.057
- Bownik, A., Kowalczyk, M., & Bańczerowski, J. (2019). Lambda-cyhalothrin affects swimming activity and physiological responses of *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 216, 805-811. doi:https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.192
- Bownik, A., & Pawlik-Skowrońska, B. (2019). Early indicators of behavioral and physiological disturbances in *Daphnia magna* (Cladocera) induced by cyanobacterial neurotoxin anatoxin-a. *Science of the Total Environment*, 695, 133913. doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133913
- Bownik, A., Pawłocik, M., & Sokołowska, N. (2017). Effects of neonicotinoid insecticide acetamiprid on swimming velocity, heart rate and thoracic limb movement of *Daphnia Magna*. *Polish Journal of Natural Sciences*, 32, 481-493.
- Bownik, A., Sokołowska, N., & Ślaska, B. (2018). Effects of apomorphine, a dopamine agonist, on *Daphnia magna*: Imaging of swimming track density as a novel tool in the assessment of swimming activity. *Science of the Total Environment*, 635, 249-258. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.04.157
- Brooke-Jones, M., Gáliková, M., & Dirksen, H. (2018). Cyanobacterial neurotoxin beta-methyl-amino-L-alanine affects dopaminergic neurons in optic ganglia and brain of *daphnia magna*. *Toxins*, 10(12). doi:10.3390/toxins10120527
- Brouwer, M., Huss, A., van der Mark, M., Nijssen, P. C. G., Mulleners, W. M., Sas, A. M. G., Vermeulen, R. C. H. (2017). Environmental exposure to pesticides and the risk of Parkinson's disease in the Netherlands. *Environment International*, 107, 100-110. doi:https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.07.001

- Colbourne, J. K., Pfrender, M. E., Gilbert, D., Thomas, W. K., Tucker, A., Oakley, T. H., Boore, J. L. (2011). The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6017), 555-561. doi:10.1126/science.1197761
- Colder, B. (2015). The basal ganglia select the expected sensory input used for predictive coding. *Frontiers in computational neuroscience*, 9, 119-119. doi:10.3389/fncom.2015.00119
- Crosby, D. G., & Tucker, R. K. (1966). Toxicity of Aquatic Herbicides to *Daphnia magna*. *Science (New York, N.Y.)*, 154(3746), 289-291.
- Daubner, S. C., Le, T., & Wang, S. (2011). Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 508(1), 1-12. doi:https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.017
- DeLong, M. R. (1990). Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in Neurosciences*, 13(7), 281-285. doi:10.1016/0166-2236(90)90110-V
- Dinis-Oliveira, R. J., Remião, F., Carmo, H., Duarte, J. A., Navarro, A. S., Bastos, M. L., & Carvalho, F. (2006). Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *NeuroToxicology*, 27(6), 1110-1122. doi:https://doi.org/10.1016/j.neuro.2006.05.012
- Dirksen, H., Neupert, S., Predel, R., Verleyen, P., Huybrechts, J., Strauss, J., Grimmelikhuijzen, C. J. P. (2011). Genomics, transcriptomics, and peptidomics of *Daphnia pulex* neuropeptides and protein hormones. *Journal of Proteome Research*, 10(10), 4478-4504. doi:10.1021/pr200284e
- Ehrenström, F., & Berglind, R. (1988). Determination of biogenic amines in the water flea, *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) and their diurnal variations using ion-pair reversed phase hplc with electrochemical detection. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative*, 90(1), 123-132. doi:10.1016/0742-8413(88)90108-9
- Friberg-Jensen, U., Nachman, G., & Christoffersen, K. S. (2010). Early signs of lethal effects in *Daphnia magna* (Branchiopoda, Cladocera) exposed to the insecticide cypermethrin and the fungicide azoxystrobin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(10), 2371-2378. doi:10.1002/etc.290
- Fritsch, M., Bininda-Emonds, O. R. P., & Richter, S. (2013). Unraveling the origin of Cladocera by identifying heterochrony in the developmental sequences of Branchiopoda. *Frontiers in Zoology*, 10(1). doi:10.1186/1742-9994-10-35
- Gerhardt, A. (2011). GamTox: A Low-Cost Multimetric Ecotoxicity Test with *Gammarus* spp. for In and Ex Situ Application. *International Journal of Zoology*, 2011. doi:10.1155/2011/574536
- Hansen, L. R., & Roslev, P. (2016). Behavioral responses of juvenile *Daphnia magna* after exposure to glyphosate and glyphosate-copper complexes. *Aquatic Toxicology*, 179, 36-43. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.08.010
- Hayes, M. T. (2019). Parkinson's Disease and Parkinsonism. *The American Journal of Medicine*. doi:https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2019.03.001

- Hou, L., Sun, F., Huang, R., Sun, W., Zhang, D., & Wang, Q. (2019). Inhibition of NADPH oxidase by apocynin prevents learning and memory deficits in a mouse Parkinson's disease model. *Redox biology*, 22, 101134-101134. doi:10.1016/j.redox.2019.101134
- Hurley, P. J., Elsworth, J. D., Whittaker, M. C., Roth, R. H., & Redmond, D. E. (2011). Aged monkeys as a partial model for Parkinson's disease. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 99(3), 324-332. doi:https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.05.007
- Ikuno, E., Matsumoto, T., Okubo, T., Itoi, S., & Sugita, H. (2008). Difference in the sensitivity to chemical compounds between female and male neonates of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology*, 23(5), 570-575. doi:10.1002/tox.20403
- Kalia, L. V., & Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *The Lancet*, 386(9996), 896-912. doi:https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3
- Kim, B. S., Park, Y. K., Jeong, M. H., You, A. S., Lee, Y. H., Yang, Y. J., & Ahn, Y. J. (2009). Toxicity of paraquat to *Daphnia magna* under different exposure conditions associated with Korean agricultural conditions. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 12(3), 330-336. doi:10.1080/14634980903126637
- Kirsch, R., & Richter, S. (2007). The nervous system of *Leptodora kindtii* (Branchiopoda, Cladocera) surveyed with Confocal Scanning Microscopy (CLSM), including general remarks on the branchiopod neuromorphological ground pattern. *Arthropod Structure & Development*, 36(2), 143-156. doi:https://doi.org/10.1016/j.asd.2006.08.013
- Kravitz, A. V., & Kreitzer, A. C. (2012). Striatal mechanisms underlying movement, reinforcement, and punishment. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 27(3), 167-177. doi:10.1152/physiol.00004.2012
- Kress, T., Harzsch, S., & Dirksen, H. (2016). Neuroanatomy of the optic ganglia and central brain of the water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). *Cell and Tissue Research*, 363(3), 649-677. doi:10.1007/s00441-015-2279-4
- Lanciego, J. L., Luquin, N., & Obeso, J. A. (2012). Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(12). doi:10.1101/cshperspect.a009621
- Lim, S.-Y., Tan, A. H., Ahmad-Annuar, A., Klein, C., Tan, L. C. S., Rosales, R. L., Lang, A. E. (2019). Parkinson's disease in the Western Pacific Region. *The Lancet Neurology*. doi:https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30195-4
- Lou, D., Chang, X., Li, W., Zhao, Q., Wang, Y., & Zhou, Z. (2012). Paraquat affects the homeostasis of dopaminergic system in PC12 cells. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103(2), 81-86. doi:https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.04.001
- Marshall, L. J., & Willett, C. (2018). Parkinson's disease research: adopting a more human perspective to accelerate advances. *Drug Discovery Today*, 23(12), 1950-1961. doi:https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.09.010
- McCoole, M. D., Atkinson, N. J., Graham, D. I., Grasser, E. B., Joselow, A. L., McCall, N. M., Christie, A. E. (2012). Genomic analyses of aminergic signaling systems (dopamine, octopamine and serotonin) in *Daphnia pulex*. *Comparative Biochemistry and*

- Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, 7(1), 35-58.  
doi:10.1016/j.cbd.2011.10.005
- McCooles, M. D., D'Andrea, B. T., Baer, K. N., & Christie, A. E. (2012). Genomic analyses of gas (nitric oxide and carbon monoxide) and small molecule transmitter (acetylcholine, glutamate and GABA) signaling systems in *Daphnia pulex*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, 7(2), 124-160.  
doi:10.1016/j.cbd.2012.01.001
- Meredith, G. E., Sonsalla, P. K., & Chesselet, M. F. (2008). Animal models of Parkinson's disease progression. *Acta Neuropathologica*, 115(4), 385-398. doi:10.1007/s00401-008-0350-x
- Moretto, A., & Colosio, C. (2011). Biochemical and toxicological evidence of neurological effects of pesticides: The example of Parkinson's disease. *NeuroToxicology*, 32(4), 383-391. doi:10.1016/j.neuro.2011.03.004
- Park, J. (2016). Movement Disorders Following Cerebrovascular Lesion in the Basal Ganglia Circuit. *Journal of movement disorders*, 9(2), 71-79. doi:10.14802/jmd.16005
- Park, S. Y., & Choi, J. (2007). Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. *Environment International*, 33(6), 817-822.  
doi:https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.03.014
- Pyati, U. J., Look, A. T., & Hammerschmidt, M. (2007). Zebrafish as a powerful vertebrate model system for in vivo studies of cell death. *Seminars in Cancer Biology*, 17(2), 154-165. doi:https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.11.007
- Rainville, L. C., Coelho, A. V., & Sheehan, D. (2015). Application of a redox-proteomics toolbox to *daphnia magna* challenged with model pro-oxidants copper and paraquat. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(1), 84-91. doi:10.1002/etc.2761
- Siciliano, A., Gesuele, R., Pagano, G., & Guida, M. (2015). *How Daphnia (Cladocera) Assays may be used as Bioindicators of Health Effects?*
- Smirnov, N. N. (2017). Chapter 13 - Nervous System and Sense Organs. In N. N. Smirnov (Ed.), *Physiology of the Cladocera (Second Edition)* (pp. 187-210): Academic Press.
- Tenreiro, S., Franssens, V., Winderickx, J., & Outeiro, T. F. (2017). Yeast models of Parkinson's disease-associated molecular pathologies. *Current Opinion in Genetics and Development*, 44, 74-83. doi:10.1016/j.gde.2017.01.013
- Vaz, R. L., Outeiro, T. F., & Ferreira, J. J. (2018). Zebrafish as an Animal Model for Drug Discovery in Parkinson's Disease and Other Movement Disorders: A Systematic Review. *Frontiers in neurology*, 9, 347-347. doi:10.3389/fneur.2018.00347
- Wang, X. H., Souders, C. L., Zhao, Y. H., & Martyniuk, C. J. (2018). Paraquat affects mitochondrial bioenergetics, dopamine system expression, and locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 191, 106-117.  
doi:https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.032

- Weiss, L. C., Leese, F., Laforsch, C., & Tollrian, R. (2015). Dopamine is a key regulator in the signalling pathway underlying predatorinduced defences in *Daphnia*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1816). doi:10.1098/rspb.2015.1440
- Whitworth, A. J. (2011). 1 - *Drosophila* Models of Parkinson's Disease. In T. Friedmann, J. C. Dunlap, & S. F. Goodwin (Eds.), *Advances in Genetics* (Vol. 73, pp. 1-50): Academic Press.
- Zein, M. A., McElmurry, S. P., Kashian, D. R., Savolainen, P. T., & Pitts, D. K. (2014). Optical bioassay for measuring sublethal toxicity of insecticides in *Daphnia pulex*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(1), 144-151. doi:10.1002/etc.2404

# Anexos

## Anexo 1 - Composição do Meio *ASTM Hard Water*

O meio é preparado em jerricãs de 20 L de polipropileno.

Para 20 L de água destilada, adicionar:

2400 mg  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (primeiramente diluído em água destilada)

4914,4 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

3840 mg  $\text{NaHCO}_3$

160 mg KCl

Ajustar o pH a 7,80.

Adicionar 1ml da vitamina ASTM, previamente descongelada.

### Composição da Vitamina:

Para 100ml de água mili-Q, adicionar:

150mg de hidrocloreto de tiamina

2 mg de cianocobalamina

1,5 mg de biotina

Numa câmara de fluxo laminar, filtrar a solução por um filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  e separar em alíquotas de 1 mL. As alíquotas são mantidas a  $-20^\circ\text{C}$ .

## Anexo 2 - Meio MBL

Primeiramente, são preparadas as soluções stock de acordo com a tabela seguinte que devem ser mantidas a 4°C.

Tabela 9: Reagentes necessários para a preparação das soluções stock utilizadas para ASTM

<i>Soluções stock</i>	<i>Por litro de água destilada</i>	
1. CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	36.76 g	
2. MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	36.97 g	
3. NaHCO <sub>3</sub>	12.60 g	
4. K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.71 g	
5. NaNO <sub>3</sub>	85.01 g	
6. Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	28.42 g	
7. Na <sub>2</sub> EDTA	4.36 g	
8. FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	3.15 g	
9. Mix de Metal CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.01 g 0.022 g 0.01 g 0.18 g 0.006 g	Adicionar cada constituente separadamente a ~750mL de água destilada, dissolvendo-se completamente entre as adições. Finalmente perfazer 1L com água destilada.
10. Stock de Vitamina Cianocobalamina (vitamina B12) Tiamina HCl (vitamina B1) Biotina	0.0005 g. L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O 0.10 g. L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O 0.0005 g. L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O	
11. Stock de Tris	250.0 g.L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O	

Adicionar:

1mL das soluções 1-9 por cada 1L de água destilada,

2ml da solução 11 por cada 1L de água destilada.

Ajustar o pH a 7,2.

Autoclavar.

Adicionar 1 ml da solução 10 por cada 8L de água destilada (após o meio estar completamente arrefecido).

### **Anexo 3 - Extrato de Alga**

Diluir 9 ml de extrato de alga concentrado em 1L de água Mili-Q.

Ler a absorvância do extrato de alga previamente preparado e diluído (1/10) no espectrofotômetro visível (absorvância deve estar entre 0,610 e 0,630 a 400nm).

Filtrar o extrato de alga diluído a vácuo com um filtro de membrana de celulose de acetato com um tamanho de poro de 0.2 $\mu$ m.

Após a filtração, é armazenado no escuro a uma temperatura de 4°C.