

## Efeitos motores da rotenona em *zebrafish* como modelo animal da doença de Parkinson-like

Motor effects of rotenone in *zebrafish* as an animal model of Parkinson-like disease

Efectos motores de la rotenona en *zebrafish* como modelo animal de enfermedad similar a la de Parkinson

André Lucas Corrêa de Andrade<sup>1</sup>, Renatta Priscilla Ferreira Silva<sup>1</sup>, Jadson Freitas da Silva<sup>2</sup>, Pabyton Gonçalves Cadena<sup>1,2</sup>.

### RESUMO

**Objetivo:** Analisar a indução de sintomas semelhantes à Doença de Parkinson em *zebrafish* pela exposição à rotenona. **Métodos:** Trata-se de um estudo experimental, conduzido em *zebrafish* adultos divididos em três grupos, um grupo controle, exposto à 1% (v/v) de DMSO e dois grupos expostos à 2 e 5 µg/L de rotenona por 28 dias consecutivos. Foram avaliados a atividade locomotora dos animais nos seguintes parâmetros: distância total, velocidade média e tempo parado. Parâmetros não-motores foram avaliados no teste de preferência claro/escuro para observar alterações comportamentais. **Resultados:** Reduções significativas entre os grupos expostos à rotenona (2 e 5 µg/L) em relação ao grupo controle foram observadas nos parâmetros de distância total (14,97 e 18,84%), velocidade média (15,05 e 18,39%) e número de linhas cruzadas (15,74 e 21,96%). Aumento do tempo parado de 82,15% foi observado apenas no grupo exposto à 5 µg/L de rotenona. Alterações na preferência de claro/escuro não foram observadas. A taxa de mortalidade foi de 15 e 35% para os grupos com 2 e 5 µg/L de rotenona, respectivamente. **Conclusão:** As concentrações de rotenona estudadas foram capazes de produzir efeitos negativos na atividade locomotora dos peixes, causando sintomas motores semelhantes à Doença de Parkinson.

**Palavras-chave:** Doença de Parkinson, Atividade locomotora, Modelo animal.

### ABSTRACT

**Objective:** Analyze the induction of Parkinson-like disease symptoms in zebrafish by rotenone exposure. **Methods:** This is an experimental study conducted on adult zebrafish divided into three different groups, a control group exposed to 1% (v/v) DMSO and two groups exposed to 2 and 5 µg/L of rotenone for 28 consecutive days. The locomotor activity of the animals was evaluated in the following parameters: total distance, average speed, and stopped time. Non-motor parameters were evaluated in the light/dark preference test to observe behavioral changes. **Results:** Significant reductions between the groups exposed to rotenone (2 and 5 µg/L) compared to the control group were observed in the parameters of the total distance (14.97 and 18.84%), mean speed (15.05 and 18.39%), and the number of crossed lines (15.74 and 21.96%). An increase in downtime of 82.15% was observed only in the group exposed to 5 µg/L of rotenone. Changes in light/dark preference were not observed. The mortality rate was 15 and 35% for the 2 and 5 µg/L rotenone groups, respectively. **Conclusion:** The rotenone concentrations studied were able to produce negative effects on the locomotor activity of fish, causing Parkinson-like disease motor symptoms.

**Key words:** Parkinson's disease, Locomotor activity, Animal model.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife - PE.

<sup>2</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife - PE.

## RESUMEN

**Objetivo:** Analizar la inducción de síntomas similares a los de la enfermedad de Parkinson en *zebrafish* por exposición a rotenona. **Métodos:** Este es un estudio experimental realizado en *zebrafish* adultos divididos en tres grupos diferentes, un grupo control expuesto a DMSO al 1% (v/v) y dos grupos expuestos a 2 y 5 µg/L de rotenona durante 28 días consecutivos. La actividad locomotora de los animales se evaluó en los siguientes parámetros: distancia total, velocidad promedio y tiempo detenido. Los parámetros no motores se evaluaron en la prueba de preferencia de luz/oscuridad para observar los cambios de comportamiento. **Resultados:** Se observaron reducciones significativas entre los grupos expuestos a rotenona (2 y 5 µg/L) en relación al grupo control en los parámetros de distancia total (14,97 y 18,84%), velocidad media (15,05 y 18,39%) y número de líneas cruzadas (15,74 y 21,96%). Se observó un aumento del tiempo de inactividad del 82,15 % en el grupo expuesto a 5 µg/L de rotenona. No se observaron cambios en la preferencia de luz/oscuridad. La tasa de mortalidad fue del 15 y 35% para los grupos de rotenona de 2 y 5 µg/L, respectivamente. **Conclusión:** Las concentraciones de rotenona estudiadas pudieron producir efectos negativos en la actividad locomotora de los peces, provocando síntomas motores similares a los de la enfermedad de Parkinson.

**Palabras clave:** Enfermedad de Parkinson, Actividad locomotora, Modelo animal.

## INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) é um distúrbio neurodegenerativo progressivo classicamente caracterizado por causar sintomas motores, como bradicinesia, tremor, rigidez e instabilidade de postura (DICKSON DW, 2018). O tratamento para DP é bastante complexo e reduz apenas os sintomas motores, pois ainda não há tratamento efetivo ou medicamento que possa interromper ou retardar o processo de neurodegeneração. No entanto, a DP não é mais considerada um transtorno puramente motor, mas uma desordem multissistêmica e multi-sintomática com sintomas também não motores (GAO G, et al., 2019). Entre os sintomas não motores, a depressão e ansiedade são comuns em pacientes com DP e estão relacionadas com a diminuição da qualidade de vida (LEENTJENS AF, 2015).

Poewe W, et al. (2017) mostraram que a disfunção neuronal da DP pode se iniciar antes dos sintomas motores aparentes, com alterações comportamentais relacionadas a ansiedade, depressão e demência. Além dos sintomas motores da DP, há outros sintomas não motores como a hiposmia, desordens no sono, alterações de personalidade e dor. Ainda, em portadores com a doença em estágios mais avançados ocorrem distúrbios neuropsiquiátricos que desencadeiam a diminuição dos movimentos voluntários, incapacitando e limitando o portador por toda a vida (SANTOS GF, et al., 2022).

Como não existe um tratamento definitivo para a DP, o estudo de modelos animais padronizados que ofereçam uma sintomatologia semelhante a DP sendo chamada de Doença de Parkinson-like (DP-like) é imprescindível para o desenvolvimento e avaliação de candidatos a fármacos. Um dos modelos animais que estão sendo mais utilizados para pesquisas de doenças neurodegenerativas e triagem de fármacos é o *zebrafish* (*Danio rerio*). Esse peixe se adequa à ensaios *in vivo* em larga escala, devido ao seu pequeno tamanho e rápida reprodução (VAZ RL, et al., 2018). Embora possua evidentes diferenças entre peixes e mamíferos, o *zebrafish* possui homologia morfológica, biológica e comportamental com os mamíferos, incluindo a estrutura anatômica do sistema nervoso, o que garante sua efetividade no estudo de doenças humanas (BASNET RM, et al., 2019).

Ainda, essa espécie pode ser utilizada como um bom modelo animal em relação a aspectos bioéticos visto que Cassar S, et al. (2020) descreveram que o *zebrafish* se enquadra no princípio de bem-estar animal dos 3R's por: i. Substituir (*Replacement*) modelos mamíferos por animais com níveis taxonômicos mais baixos (teleosteos); ii. Reduzir (*Reduction*) a seleção de compostos candidatos em mamíferos, diminuindo assim o número de roedores a serem usados nas fases subsequentes de pesquisa; iii. Refinar (*Refinement*) com a administração facilitada dos compostos a serem testados no meio aquoso por imersão, diminuindo assim a realização de procedimentos invasivos.

Com a finalidade de provocar sintomas motores e não motores similares aos da DP em modelos animais para testar fármacos candidatos, neurotoxinas vêm sendo estudadas. Dentre as substâncias mais utilizadas estão a rotenona, o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP), a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e o paraquat (KALYN M, et al., 2020). De acordo com Kalyn M, et al. (2020), o *zebrafish* se mostrou capaz de incorporar os mecanismos da neurotoxicidade provocados por essas substâncias, apesar dos testes estarem mais avançados em modelos mamíferos.

A rotenona é um derivado botânico comumente utilizada como um inseticida/pesticida (DOYLE JM e CROLL RP, 2022). O mecanismo primário de toxicidade da rotenona é pela potente inibição da via específica do complexo mitocondrial I provocando sua disfunção (KALYN M, et al., 2020). A exposição crônica dessa substância causa degeneração seletiva dos neurônios dopaminérgicos da substância nigra (TIEU K, 2011).

Adicionalmente, a rotenona é uma substância bastante lipofílica que ultrapassa facilmente a membrana hematoencefálica e entra nas células sem depender de um transportador específico (IRWIN MH, et al., 2013). Além das características acima mencionadas, essa substância tem como vantagem a possibilidade da exposição do *zebrafish* ser por imersão, reduzindo a necessidade de procedimentos invasivos por injeções, como na indução à DP-like com MPTP em *zebrafish* adulto (KHOTIMAH H, et al., 2015; WANG Y, et al., 2017; SELVARAJ V, et al., 2019).

A análise das funções motoras de *zebrafish* expostos à rotenona, pode ser utilizada como um sistema poderoso para simular o fenótipo associado com desordens neurológicas como a DP (SELVARAJ V, et al., 2019). Além da facilidade da aquisição de dados sobre atividade locomotora, o *zebrafish* possui um vasto repertório comportamental que permite acessar comportamentos semelhantes à ansiedade, um dos sintomas não motores da DP (GEBAUER DL, et al., 2011). Dessa forma, o uso da atividade locomotora e de avaliação de comportamentos do tipo ansiedade como ferramentas de análise possui uma abordagem eficiente, não invasiva e econômica com uma larga gama de aplicações. Podemos citar a descoberta e triagem de candidatos a fármacos, detecção de desordens neurocomportamentais e toxicologia química (TANG W e SU D, 2012).

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar concentrações de rotenona capazes de induzir sintomas motores e não-motores de DP-like em *zebrafish* na fase adulta. Usamos como variáveis resposta, a análise da atividade locomotora, preferência de claro/escuro e de taxa de mortalidade, com finalidade de avaliar se este modelo animal pode ser usado com os métodos descritos acima para estudar sintomas da DP-like em futuras triagens de candidatos a fármacos.

## MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal (LECA) na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), biotério cadastrado na plataforma do Conselho Nacional de Experimentação Animal (CIUCA-CONCEA). Os protocolos utilizados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRPE, protocolo número 114/2018.

Os espécimes adultos de *zebrafish* (*Danio rerio*), linhagem selvagem, foram obtidos a partir do comércio local (Recife - Pernambuco, Brasil), mantidos em quarentena para detectar e confirmar a ausência de doenças e patógenos (SILVA MCG, et al., 2019). Posteriormente, foram aclimatados em aquários de 60 litros em um sistema de recirculação com filtragem de água mantendo os parâmetros abióticos em  $26 \pm 1$  °C, pH 7,0, sendo estes ótimos para a sanidade dos animais (OECD 203, 1992). Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial extrusada (40% de proteína bruta). A aclimação e experimentos foram realizados em um fotoperíodo de 12 claro/12 escuro. Todas as condições físico-químicas da água, de ciclo claro/escuro e de alimentação durante o experimento foram mantidas iguais ao período de aclimação.

Para determinar os efeitos da exposição à rotenona (SIGMA, R8875, fórmula empírica:  $C_{23}H_{22}O_6$ ,  $\geq 95\%$  de pureza), os animais foram divididos em 3 grupos com dez peixes adultos (5 machos/5 fêmeas),

selecionados aleatoriamente e transferidos para aquários de acrílico teste de 10 L, com uma densidade de 1 animal por litro. Cada grupo consistiu uma duplicata, totalizando 20 animais por grupo (60 animais no total). O primeiro grupo (Controle) foi exposto apenas à 1% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO). O segundo grupo foi exposto à concentração de 2 µg/L de rotenona diluída em 1% (v/v) de DMSO. O terceiro grupo foi exposto à concentração de 5 µg/L de rotenona diluída em 1% (v/v) de DMSO. O período de exposição à rotenona foi de 28 dias.

Trocas completas de água a cada dois dias foram realizadas para reposição das concentrações de rotenona em cada aquário, pois o tempo de meia-vida da rotenona é curto, aproximadamente 9 dias em condições de laboratório à temperatura de 25 °C (MARKING LL e BILLS TD, 1976). A presença de animais mortos foi averiguada diariamente para cálculo da taxa de mortalidade e o animal morto retirado imediatamente.

A atividade locomotora de *zebrafish* foi analisada em um aquário acrílico preenchido com 2 L de água (L = 40 cm × W = 25 cm × H = 20 cm). Foram gravados 3 vídeos de 3 minutos por grupo em duplicata (6 vídeos por grupo) duas vezes por semana, com auxílio de uma torre de filmagem de construção própria (patente BR1020190090073). Os vídeos gravados foram analisados pelo software *ZebTrack* (PINHEIRO-DA-SILVA J, et al., 2017), que registra a movimentação dos animais automaticamente e disponibiliza os seguintes dados como resultados: distância total (cm), velocidade média (cm/s), tempo parado (s) e um registro gráfico de todo caminho percorrido pelo peixe no aquário.

Adicionalmente, foi utilizada uma metodologia proposta por Khotimah H, et al. (2015), na qual foram desenhados nos aquários três linhas verticais com a mesma distância entre elas. Durante o período da gravação (3 min) foram contados o número de linhas cruzadas, sendo assim a distância total que o animal percorreu foi diretamente proporcional ao número de linhas que ele cruzou. A atividade locomotora foi calculada a partir do número total de linhas que o peixe cruzou, dividido pelo tempo e expresso pelo número de linhas/3 min.

Para avaliação dos sintomas não motores, o teste de preferência claro/escuro foi realizado conforme metodologia adaptada de Gebauer DL, et al. (2011), com intuito de avaliar a ansiedade como um sintoma não motor da exposição à rotenona. O aquário (L = 40 cm × W = 25 cm × H = 20 cm) de vidro utilizado nesse teste faz parte de uma patente própria (BR1020190090073), no qual possuía uma área escura e outra clara de tamanho igual, separados ao meio por um vidro com abertura de 5 cm x 5 cm e o nível da água foi mantido a uma profundidade de 7 cm (total de 7 L de água).

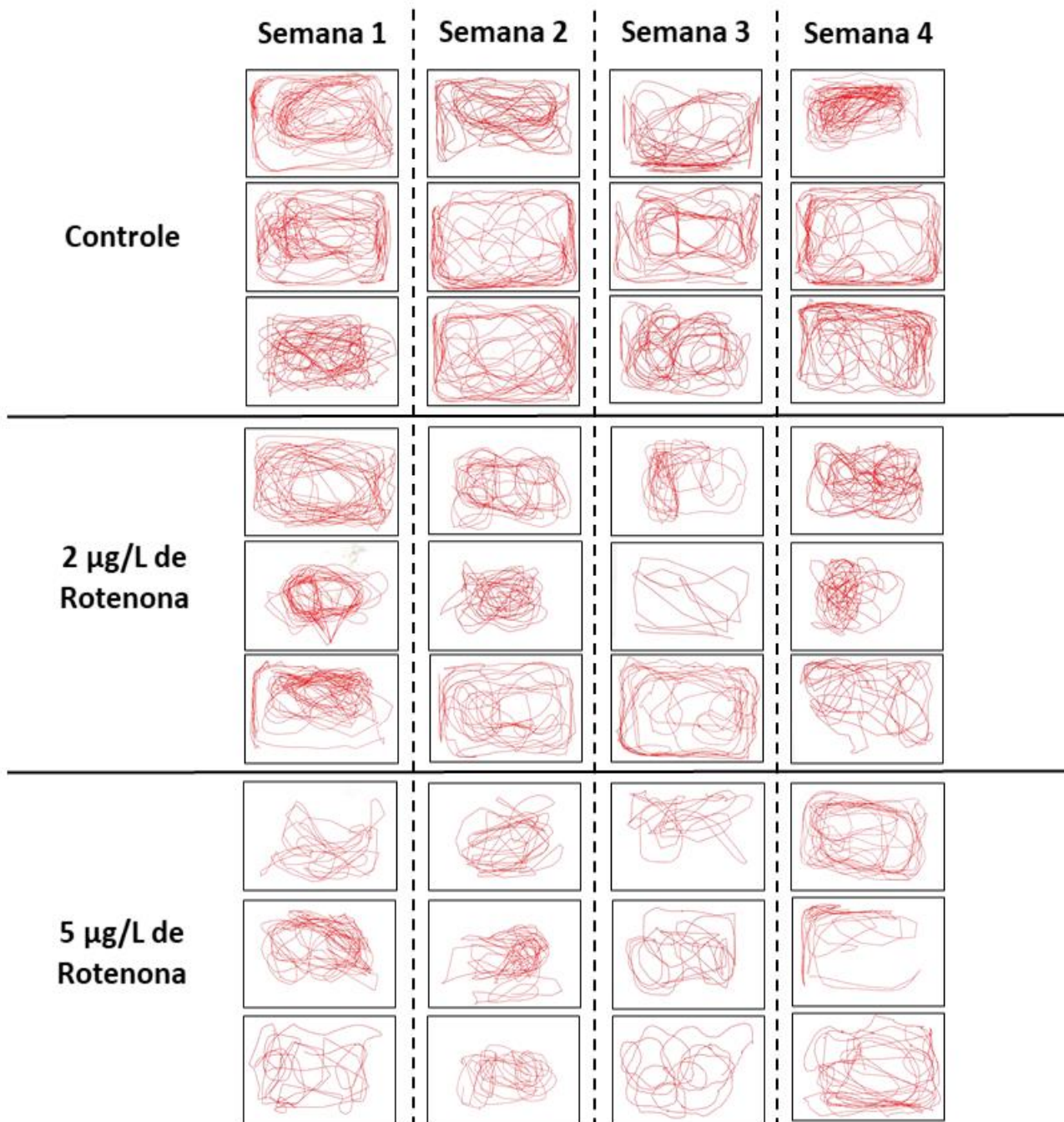
Os peixes foram colocados individualmente no compartimento de claro e podiam nadar livremente por 5 minutos com a gravação iniciada a partir da entrada do peixe no compartimento escuro. Foram gravados 3 vídeos de 10 minutos por grupo (3 vídeos por grupo) com auxílio de uma torre de filmagem própria (patente BR1020190090073). Após a análise dos vídeos, o tempo gasto em cada área foi registrado para o cálculo da porcentagem da preferência entre claro/escuro.

Os resultados foram expressos na forma de média e desvio padrão analisados por *one-way* ANOVA, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey com  $p < 0,05$ . Para as análises estatísticas foi utilizado o software Origin Pro Academic 2015 (Origem Lab. Northampton, MA, EUA).

## RESULTADOS

Alterações na atividade locomotora de *zebrafish* foram observadas devido a exposição à rotenona em todos os parâmetros estudados. As avaliações realizadas pelo software *ZebTrack* geraram registro gráficos da atividade locomotora dos peixes, a linha vermelha representa o caminho percorrido durante a gravação. Foi possível observar que os peixes dos grupos expostos à rotenona durante as quatro semanas do experimento exibiram uma diminuição do movimento pelo aquário, indicando uma menor atividade locomotora e mais tempo parado em comparação ao grupo controle (**Figura 1**).

**Figura 1** - Registro gráfico da atividade locomotora de zebrafish (*Danio rerio*) durante quatro semanas de exposição à 2 e 5 µg/L de rotenona.



**Fonte:** Andrade ALC, et al., 2022.

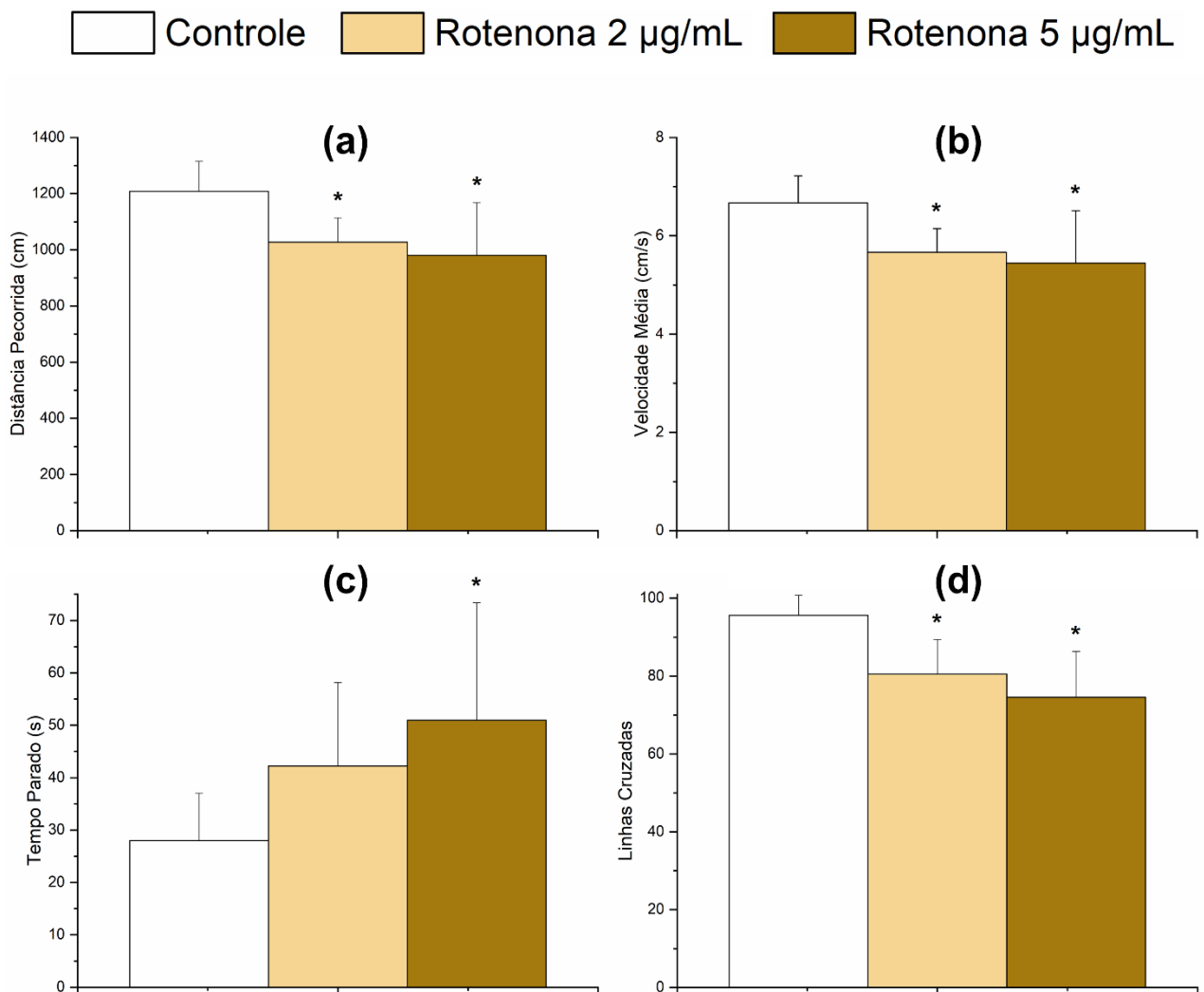
A distância total (cm) percorrida pelos animais durante as gravações apresentaram reduções significativas de 14,97 e 18,84% nos grupos expostos à 2 e 5 µg/L de rotenona, respectivamente, não diferindo entre eles, mas diferindo em comparação ao que o grupo controle percorreu (**Figura 2a**).

Referente a velocidade média (cm/s), o grupo exposto à 2 µg/L reduziu 15,05% e o grupo exposto à 5 µg/L reduziu 18,39%, não diferindo entre eles, mas diferindo em comparação ao grupo controle (**Figura 2b**).

Em relação ao tempo parado dos animais, o único grupo exposto à rotenona que apresentou diferença significativa foi o grupo de 5 µg/L com aumento de 82,15% em comparação ao grupo controle (**Figura 2c**).

A atividade locomotora mensurada pela contagem do número de linhas cruzadas pelos animais durante as gravações apresentou resultado similar ao mensurado pelo software *ZebTrack*. O número de linhas cruzadas pelos peixes expostos a 2 µg/L de rotenona apresentou uma redução de 15,74% e no grupo exposto a 5 µg/L de rotenona a redução foi de 21,96%, sem diferença entre eles, mas diferindo em comparação ao número de linhas que os animais do grupo controle cruzaram (**Figura 2d**).

**Figura 2** - *Zebrafish* (*Danio rerio*) exposto à rotenona apresentou alterações na atividade locomotora.

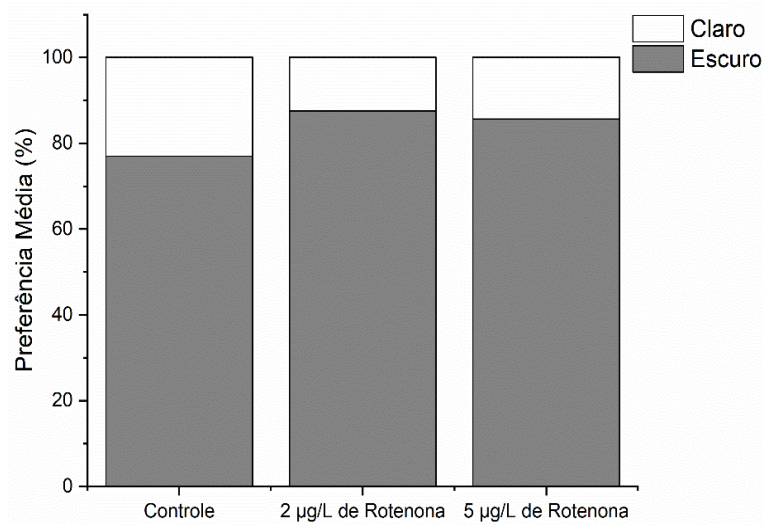


**Legenda:** (a) média da distância percorrida em centímetros; (b) velocidade média em centímetros por segundos; (c) média do tempo parado em segundos; (d) média do número de linhas cruzadas. \*Representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em comparação ao grupo controle.

**Fonte:** Andrade ALC, et al., 2022.

O teste de preferência claro/escuro foi utilizado para examinar os padrões comportamentais similares ao de ansiedade. Não foi observado diferença significativa em relação a porcentagem de preferência média entre os grupos. A preferência média pela região escura foi a mais observada em todos os grupos testados o que está de acordo com o comportamento padrão do *zebrafish* (**Figura 3**) (WANG Y, et al., 2017).

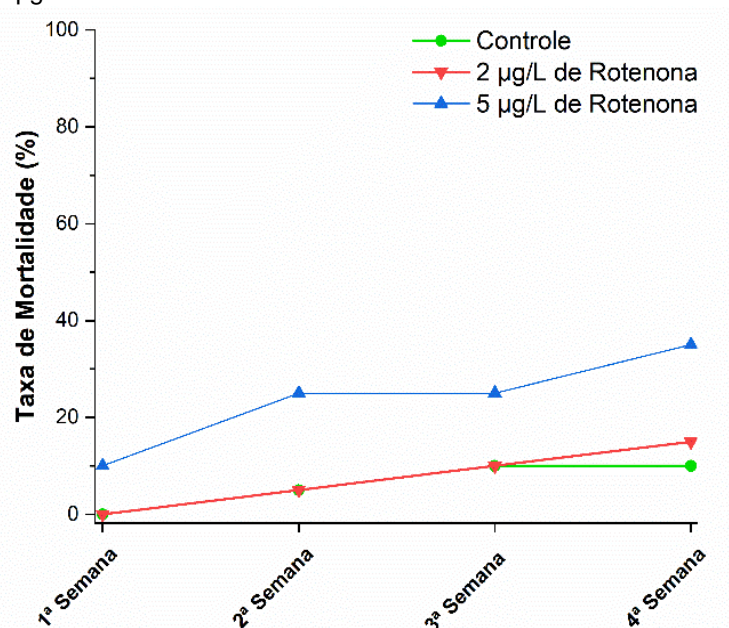
**Figura 3** - Porcentagem da preferência média entre região Clara e região Escura de *zebrafish* (*Danio rerio*) expostos a concentrações de rotenona.



Fonte: Andrade ALC, et al., 2022.

A taxa de mortalidade foi calculada semanalmente para avaliar a toxicidade da exposição à rotenona. A mortalidade observada no grupo controle durante todo experimento não ultrapassou taxa de 10%, uma condição de validade do teste proposta pela OECD 203 (1992). Durante a 1ª semana foi observado mortalidade de 10% apenas no grupo exposto à 5 µg/L de rotenona. Na 2ª semana, a taxa aumentou para 25% no grupo com 5 µg/L e foi observado no grupo controle e com 2 µg/L de rotenona, uma taxa de mortalidade de 5%. Durante a 3ª semana, foi observado mortalidade apenas no grupo controle (10%) e no grupo exposto à 2 µg/L de rotenona (10%). Na última semana, o grupo controle continuou com a taxa de 10%, o grupo com 2 µg/L aumentou para 15% e o grupo com 5 µg/L terminou com 35% de mortalidade (Figura 4).

**Figura 4** – Taxa de mortalidade durante as quatro semanas do teste com *zebrafish* (*Danio rerio*) expostos a concentrações de 2 e 5 µg/L de rotenona.



Fonte: Andrade ALC, et al., 2022.

## DISCUSSÃO

Em nossas análises, a exposição as concentrações de 2 e 5 µg/L de rotenona reduziram significativamente os padrões de locomoção nos peixes na maioria dos parâmetros locomotores avaliados. No entanto, a menor concentração utilizada (2 µg/L) de rotenona não provocou aumento no tempo que o animal permanecia parado durante as filmagens. Isso indica que a rotenona não diminuiu o padrão de tempo de locomoção do *zebrafish* do grupo exposto a 2 µg/L, mas afetou diretamente a capacidade de se locomover em velocidade média normal e distância percorrida. Esses efeitos observados podem ter uma associação significativa com o sintoma da bradicinesia (diminuição da mobilidade) observada na DP, segundo Sarath Babu S, et al. (2016). Já em relação a maior concentração de rotenona (5 µg/L), além do *zebrafish* apresentar reduções na velocidade média e distância percorrida, foi observado um aumento no tempo parado desses animais, indicando sintomas semelhantes à discinesia (perda de movimentos) (SARATH BABU S, et al., 2016).

Em um estudo que avaliou a atividade locomotora apenas pela contagem do número de linhas cruzadas em linhagem selvagem de *zebrafish* (KHOTIMAH H, et al., 2015), foi observado uma redução da locomoção dos animais expostos à 5 µg/L de rotenona similar ao observado em nosso estudo. Os mesmos autores descreveram que a rotenona em 2 µg/L não apresentou efeitos na locomoção diferentemente do que foi visto em nossos achados. Ainda, Khotimah H, et al. (2015), relacionou esta redução da atividade locomotora com a exposição à rotenona pela redução dos níveis dopaminérgicos cerebrais.

Também é possível observar que a menor concentração de rotenona testada (2 µg/L) em nosso estudo foi suficiente para induzir sintomas motores no *zebrafish*, inclusive com uma taxa de mortalidade menor quando comparada ao grupo com maior concentração de rotenona (5 µg/L). Esses resultados sugerem que a análise da atividade locomotora pode ser utilizada para avaliar sintomas motores DP-like em *zebrafish* adultos preferencialmente expostos à 2 µg/L de rotenona, pois neste caso o foco de avaliação passa a ser parâmetros não letais como a atividade locomotora e teste claro/escuro.

Diante do exposto, a redução da atividade locomotora observada durante as 4 semanas no nosso estudo pode ter sido causada, principalmente, por uma perda de dopamina no cérebro. De acordo com Wirdefeldt K, et al. (2011), os sintomas iniciais da DP não se desenvolvem até que cerca de 50-60% dos neurônios da substância nigra sejam perdidos e cerca de 80-85% do conteúdo de dopamina do corpo estriado esteja esgotado. Desta forma, supõe-se que a exposição crônica à rotenona foi capaz de danificar mais da metade dos neurônios dopaminérgicos dos peixes expostos. Visto que a rotenona é uma substância neurotóxica que inibe a atividade do complexo mitocondrial I, proporciona um ambiente de estresse oxidativo na célula, prejudicando o metabolismo energético e, eventualmente, causando a perda neuronal da dopamina (MAKHIJA DT e JAGTAP AG, 2014). Diante deste efeito tóxico, podemos supor que estes mecanismos descritos foram fundamentais para induzir uma resposta DP-like no nosso estudo.

A rotenona tem sido amplamente utilizada no estabelecimento de roedores como modelo animal para a DP (WANG Y, et al., 2017). Isso é devido ao fato que a rotenona possui vantagens em relação as outras neurotoxinas, como a 6-OHDA e a MPTP, porque o acúmulo da  $\alpha$ -sinucleína é visualizado em ratos tratados com rotenona (DOYLE JM e CROLL RP, 2022). O mecanismo de ação da rotenona é similar ao do MPTP pelo comprometimento do complexo mitocondrial I (KALYN M, et al., 2020).

Devido a isso, trabalhos recentes ainda utilizam injeções de MPTP em *zebrafish* como modelo para o estudo da DP (SARATH BABU S, et al., 2016; SELVARAJ V, et al., 2019). No estudo realizado por Selvaraj V, et al. (2019), foi induzido sintomas DP-like em *zebrafish* com injeções de MPTP e em relação aos grupos controles foram observados resultados similares, em nosso estudo a distância média foi de 1208 cm, no referido trabalho foi de 1258,2 cm. No entanto, a injeção de MPTP apresentou uma redução mais acentuada da distância média percorrida do que a observada nos nossos grupos expostos à rotenona. Com a injeção de MPTP, a distância média percorrida foi de 585 cm, ao passo que em nossos resultados os grupos expostos à 2 e 5 µg/L (por imersão) de rotenona percorreram 1027,1 e 980,3 cm, respectivamente (SELVARAJ V, et al., 2019).

Embora a injeção de MPTP tenha provocado efeitos similares aos causados pela rotenona em nosso estudo, os padrões locomotores dos *zebrafish* expostos à MPTP apresentaram maior severidade (SELVARAJ



V, et al., 2019). Fato que pode ser explicado pelo método de injeção favorecer a velocidade de atuação neurotóxica da substância (DANG M, et al., 2016). No entanto, apesar da utilização de injeções para administração de substâncias em *zebrafish* serem eficazes como aplicação única, o método é considerado invasivo e pode causar lesões e infecções desnecessárias (DANG M, et al., 2016). Diante disso, o modelo com imersão a rotenona usado no nosso trabalho pode ser mais vantajoso.

Diante do quadro multi-sintomático da DP, o teste de preferência claro/escuro tem sido amplamente utilizado com o objetivo de avaliar a presença de sintomas neurológicos semelhantes à ansiedade e depressão em modelos animais (GEBAUER DL, et al., 2011). Inicialmente esse tipo de teste foi realizado em roedores, mas sua aplicação em *zebrafish* também é comum (WANG Y, et al., 2017).

O *zebrafish* possui preferência por ambientes escuros, padrão observado também no nosso trabalho onde os animais permaneceram mais tempo na área escura (WANG Y, et al., 2017). Entretanto, nós não observamos uma alteração no padrão de ansiedade nos animais expostos a rotenona. A ausência de alterações significativas no nosso estudo pode implicar que a exposição à rotenona não causou efeitos semelhantes ao da ansiedade, apesar de ter causado mudanças nos padrões locomotores. Futuros estudos precisam ser realizados para avaliar diferentes metodologias como em que área (clara ou escura) é usada para início desse teste.

Durante a realização do experimento, a mortalidade causada pela rotenona foi considerada baixa, com a maior concentração de rotenona (5 µg/L) causando 35% de mortalidade e gerando efeitos negativos observáveis na atividade locomotora. No entanto, a taxa de mortalidade observada na menor concentração de rotenona (2 µg/L) e o grupo controle terminaram em 15% e 10%, respectivamente. Isto indica uma baixa toxicidade na menor concentração e com capacidade de provocar alterações significativas na atividade locomotora o que é importante para a triagem de candidatos a fármacos, visto que os parâmetros subletais passam a ser mais importantes que os letais no estudo da DP.

Diante dos resultados obtidos durante a realização do nosso estudo foi possível demonstrar que a exposição à rotenona foi capaz de induzir sintomas motores da Doença de Parkinson-like em *zebrafish*, principalmente a diminuição da habilidade de movimento e rigidez, sintomas fundamentais da doença. A locomoção é uma característica indispensável do comportamento animal e sua análise possui uma grande relevância clínica para detecção de doenças neurodegenerativas (SELVARAJ V, et al., 2019). Sendo assim, a análise dos parâmetros locomotores na forma da quantificação da distância média percorrida, velocidade média e tempo parado podem oferecer informações adicionais importantes ao estudo de doenças como o Parkinson em modelos animais, além de ser economicamente vantajosa e simples para o uso em triagens de candidatos a fármacos.

## CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou se o *zebrafish* exposto as concentrações de 2 e 5 µg/L de rotenona pode ser utilizado como um modelo animal para estudos dos sintomas semelhantes ao da Doença de Parkinson mediante a avaliação de parâmetros motores e não-motores. Nosso estudo concluiu que as concentrações de rotenona utilizadas foram capazes de produzir efeitos negativos quantificáveis na atividade locomotora do *zebrafish* adulto causando sintomas motores DP-like. No entanto, a menor concentração utilizada se mostrou mais adequada, pois além de causar reduções na atividade locomotora, provocou baixa mortalidade. O modelo apresentado em nosso estudo pode possibilitar a triagem de candidatos a fármacos e com possível uso na identificação de novas estratégias terapêuticas ou de prevenção da DP.

## AGRADECIMENTOS E FINANCIAMENTO

A Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo apoio financeiro. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de estudo para André Andrade e Renatta Silva e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de produtividade a Pabyton Cadena (306947/2020-0).

**REFERÊNCIAS**

1. BASNET RM, et al. Zebrafish Larvae as a Behavioral Model in Neuropharmacology. *Biomedicines*, 2019; 7(23).
2. CASSAR S, et al. Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chemical Research in Toxicology*, 2020; 33(1): 95-118.
3. DANG M, et al. Identifying Novel Cancer Therapies Using Chemical Genetics and Zebrafish. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016; 916: 103-124.
4. DICKSON DW. Neuropathology of Parkinson disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 2018; 48: S30-S33.
5. DOYLE JM e CROLL RP. A Critical Review of Zebrafish Models of Parkinson's Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 2022; 13.
6. GAO G, et al. Gold nanoclusters for Parkinson's disease treatment. *Biomaterials*, 2019; 194:36-46.
7. GEBAUER DL, et al. Effects of anxiolytics in zebrafish: similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 2011; 99(3): 480-486.
8. IRWIN MH, et al. Mouse models of mitochondrial complex I dysfunction. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2013; 45(1): 34-40.
9. KALYN M, et al. Comprehensive Analysis of Neurotoxin-Induced Ablation of Dopaminergic Neurons in Zebrafish Larvae. *Biomedicines*, 2019; 8(1).
10. KHOTIMAH H, et al. Decreasing  $\alpha$ -synuclein aggregation by methanolic extract of *Centella asiatica* in zebrafish Parkinson's model. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2015; 5(11): 948-954.
11. LEENTJENS AF. Parkinson disease: Depression-risk factor or early symptom in Parkinson disease? *Nature Reviews Neurology*, 2015; 11(8): 432-433.
12. MAKHIJA DT, JAGTAP AG. Studies on sensitivity of zebrafish as a model organism for Parkinson's disease: Comparison with rat model. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 2014; 5(1): 39-46.
13. MARKING LL, BILLS TD. Toxicity of rotenone to fish in standardized laboratory tests. *Investigations in Fish Control*, 1976; 72:1-11.
14. OECD 203. Fish, Acute Toxicity Testing of Chemicals. OECD. 1992; 203, p. 1-9.
15. PINHEIRO-DA-SILVA J, et al. Sleep deprivation effects on object discrimination task in zebrafish (*Danio rerio*). *Animal Cognition*, 2017; 20(2): 159-169.
16. POEWE W, et al. Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 2017; 3: 17013.
17. SANTOS GF. Doença de Parkinson: Padrão epidemiológico de internações no Brasil. *Research, Society and Development*, 2022; 11(1): e13511124535.
18. SARATH BABU N, et al. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induced Parkinson's disease in zebrafish. *Proteomics*, 2016; 16: 1407-1420.
19. SELVARAJ V, et al. A simple method to study motor and non-motor behaviors in adult zebrafish. *Journal of Neuroscience Methods*, 2019; 320: 16-25.
20. SILVA, MCG, et al. The complexation of steroid hormones into cyclodextrin alters the toxic effects on the biological parameters of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 2019; 214: 330-340.
21. TANG W, SU D. Locomotion analysis and its applications in neurological disorders detection: state-of-art review. *Network Modeling Analysis in Health Informatics and Bioinformatics*, 2012; 2(1): 1-12.
22. TIEU K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2011; 1(1): a009316.
23. VAZ RL, et al. Zebrafish as an Animal Model for Drug Discovery in Parkinson's Disease and Other Movement Disorders: A Systematic Review. *Frontiers in Neurology*, 2018; 9: 347.
24. WANG Y, et al. Parkinson's disease-like motor and non-motor symptoms in rotenone-treated zebrafish. *Neurotoxicology*, 2017; 58: 103-109.
25. WILLIAMS CH, HONG CC. Multi-step usage of *in vivo* models during rational drug design and discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011; 12(4): 2262-2274.
26. WIRDEFELDT K, et al. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *European Journal of Epidemiology*, 2011; 26(Suppl 1): S1-58.