

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

PAULA FERNANDA RIBAS NEVES

**ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA, LOCOMOÇÃO E ULTRAESTRUTURA  
MUSCULAR E MITOCONDRIAL DE *Drosophila melanogaster* COM  
PARKINSONISMO INDUZIDO POR PARAQUAT**

PORTO ALEGRE

2020

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

PAULA FERNANDA RIBAS NEVES

**ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA, LOCOMOÇÃO E ULTRAESTRUTURA  
MUSCULAR E MITOCONDRIAL DE *Drosophila melanogaster* COM  
PARKINSONISMO INDUZIDO POR PARAQUAT**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Escola de Ciências da Saúde e da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do grau de Mestra em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Léder Leal Xavier

PORTO ALEGRE

2020

## Ficha Catalográfica

N518a Neves, Paula Fernanda Ribas

Análise da sobrevivência, locomoção e ultraestrutura muscular e mitocondrial de *Drosophila melanogaster* com parkinsonismo induzido por paraquat / Paula Fernanda Ribas Neves . – 2020.

70.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Léder Leal Xavier.

1. Doença de Parkinson. 2. Mitocôndria. 3. Agrotóxico. 4. Músculos indiretos de voo. 5. MET. I. Xavier, Léder Leal. II. Título.

PAULA FERNANDA RIBAS NEVES

**ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA, LOCOMOÇÃO E ULTRAESTRUTURA  
MUSCULAR E MITOCONDRIAL DE *Drosophila melanogaster* COM  
PARKINSONISMO INDUZIDO POR PARAQUAT**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Escola de Ciências da Saúde e da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para obtenção do grau de Mestra em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Léder Leal Xavier

Aprovada em: 11 de março de 2020.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dra. Betina Blochtein – PPGEEB/PUCRS

---

Prof. Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira – PPGBCM/PUCRS

---

Prof. Dr. Gunther Gehlen – FEEVALE

PORTO ALEGRE

2020

*Dedico essa dissertação a meus pais, Dóris e Jesus, com todo meu amor e gratidão, por tudo que fizeram – e ainda fazem – por mim, ao longo de toda minha vida. Desejo poder ter sido merecedora do esforço dedicado por vocês em todos aspectos, especialmente quanto à minha formação, não só como profissional, mas como mulher. Amo vocês.*

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer aos meus pais, Dóris e Jesus, por me **escolherem**. Pai... Mãe... Grifo essa palavra pois dentre tantas pessoas no mundo, vocês me escolheram como filha. Desde sempre eu soube que eu não tinha sido uma “semente” plantada na barriga, mas sim no coração de vocês. E todos os dias vocês dois me mostram, com gestos e palavras, que os conceitos que aprendi nas disciplinas de genética por vezes não passam de teoria, pois não carregar comigo a de vocês, nunca me fez ser diferente. Me desculpem pelos sumiços, por trocar os dias pelas noites, pelos chimarrões e pelos programas de TV que não vi com vocês nesses últimos meses. Com toda certeza se fiz isso, é porque espero que futuramente possa fornecer a vocês uma vida melhor, como sempre sonho. Obrigada por tudo.

Ao Prof. Dr. Léder, que me confiou essa oportunidade de mestrado, ainda que eu estivesse a somente oito meses no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual. “Patrón”, fico muito honrada de encerrar essa etapa sendo tua orientanda, foi um prazer inenarrável fazer parte desse grupo que tu orientas com maestria – espero permanecer -. Posso dizer, com toda certeza, que nesses dois anos amadureci muito como pesquisadora, e grande parte disso devo a ti, por sempre me incentivar, e por todos elogios e confiança que colocastes em mim.

Ao Prof. Dr. Régis Mestriner, pelo auxílio nas estatísticas desta dissertação.

À todas meninas do laboratório, que me ensinaram que nem todo lugar que trabalhamos é de competição. Elas me mostram todos os dias que estão sempre dispostas a me ajudar – e eu, o mesmo -. Vocês tornaram essa caminhada mais leve e divertida e, com toda certeza, essa dissertação não teria sido finalizada sem a ajuda de vocês. Obrigada Lisiê, pela confiança, quando me indicou para ser Iniciação Científica e por todo auxílio durante esses quase três anos de convivência e amizade, além das revisões do inglês do artigo durante esse último mês; Obrigada, Raquel, que com toda sua sabedoria ensina não só eu, mas todas meninas do laboratório, a como lidar com os problemas da vida. Ela faz nossos dias serem mais leves, sempre com uma palavra que acalma nossos corações. A Raquel é uma pessoa que nos faz acreditar que o mundo ainda é bom. Vida longa à nossa parceria; Laura, obrigada pelas conversas e dicas nos momentos finais do mestrado, foram essenciais para manter o controle; Louise (CID), obrigada por me ensinar que a vida às vezes é ingênua mesmo, e que tudo bem, a gente precisa ser leve! Acompanhar teu

crescimento como pesquisadora foi incrível, fico muito feliz por poder te ensinar o pouco que sei; Bruna, obrigada por ser minha companheira incansável em todos momentos, por realizar com perfeição meus experimentos, pela companhia no Simpósio. Tenho a certeza de que teu futuro será brilhante; Rafaela, obrigada por todas as vezes que tornou momentos tensos em muitas risadas, com tuas dancinhas; e por fim, mas não menos importante, obrigada Juliana, por ser a mais recente luz do nosso laboratório, tua presença sempre traz alegria e muitas risadas.

À Andrea Wieck, Pós-Doutoranda recém-chegada em nosso laboratório, que nesse curto espaço de tempo mostrou-se extremamente profissional e prática, trazendo um novo olhar e auxiliando nas correções finais e submissão do artigo científico presente nessa dissertação. Tenho certeza de que tens muito o que ensinar a todas nós. Sem palavras para a tua ajuda. Muito obrigada!

A todos meus amigos, em especial Heitor, Thomaz, Kaline, Amanda e Giovanna, por estarem sempre me exaltando como mulher e como pesquisadora. Por todas vezes que enviei uma mensagem precisando conversar ou espairecer e vocês estiveram lá, prontamente para me ouvir. Obrigada por também entenderem minhas ausências em aniversários, festas ou uma simples tarde na Redenção, logo mais comemoraremos juntos.

À CAPES, pela bolsa concedida, e não somente esta, mas a minha bolsa da graduação do Pro-Uni. Sem elas, jamais estaria chegando ao grau de Mestra.

Gostaria também de agradecer a mim, por não desistir deste sonho. Apesar da felicidade de finalizar esta etapa, sei que nem tudo são flores. Não é fácil manter uma vida acadêmica quando as possibilidades são tão desiguais. Tenho a consciência de que muitos filhos(as) de porteiros e donas de casa, assim como eu, não conseguem chegar até aqui, e por isso agradeço o mínimo de privilégio que tenho, apesar de ainda assim, não ser fácil. O amor pela ciência – infelizmente - não paga as contas. Chego ao título de Mestra com muitas incertezas do que farei logo mais, isso tudo porque, a cada dia que passa, me vejo em um país que não dá o real valor para a ciência. São tempos difíceis. **Precisamos** seguir lutando pela pesquisa.

E por fim, à todas pessoas que estiveram presentes – seja por muito ou pouco tempo – e não foram mencionadas durante essa caminhada. Algumas me mostraram que posso fazer mais do que eu imaginava. Outras abriram minha mente, apontando formas diferentes de avaliar não somente meu trabalho, mas minha vida.

Com toda certeza o universo molda nossos destinos para que possamos encontrar pessoas incríveis, e comigo não foi diferente.

Obrigada! Amo vocês.



*“Viver é enfrentar um problema atrás do outro. O modo como você o encara é que faz a diferença.”*

**Benjamin Franklin**

## RESUMO

Em seres humanos, a doença de Parkinson (DP) é um processo neurodegenerativo que pode ocorrer de forma esporádica, familiar ou associada à fatores ambientais, como a exposição à agrotóxicos como o Paraquat (PQ). A mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*, tem sido amplamente utilizada como modelo biológico para o estudo da DP familiar, envolvendo mutantes com superexpressão de genes ou genes nulos, além de estudos de parkinsonismo produzido por agentes indutores, como o PQ. Embora existam muitos estudos sobre os efeitos neuronais do PQ em *D. melanogaster*, são escassas as pesquisas sobre efeitos do PQ na ultraestrutura muscular e mitocondrial de *D. melanogaster*, tampouco seus efeitos em parâmetros de sobrevivência e locomoção, em diferentes idades, neste mesmo modelo biológico. Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a sobrevivência, locomoção e parâmetros ultraestruturais mitocondriais e musculares, utilizando-se curva de sobrevivência em 48 horas; teste de campo aberto, avaliado pelo software Anymaze; e microscopia eletrônica de transmissão (MET) associada à técnicas de morfometria planar e estereologia, em *D. melanogaster* de 2 e 15 dias de idade, tratadas com diferentes doses de PQ (0 – controle, 10, 50, 100, 150 e 200mM), diluídas no meio alimentar. Observamos que o PQ apresenta maior letalidade em moscas de 15 dias de idade, apresentando 20% de mortalidade em PQ10mM, 60% em PQ50mM e 100% em doses acima de PQ100mM. Em moscas de 2 dias de idade, uma mortalidade de 20% pode ser observada, apenas na dose de PQ150mM, sendo que PQ200mM apresenta-se como dose letal, em ambos os grupos. Em relação a locomoção, em animais de 15 dias de idade, doses de PQ10mM e PQ50mM induzem significativa redução nos seguintes parâmetros locomotores: distância percorrida, velocidade média e velocidade média no tempo móvel ( $p < 0,05$ ), indicando sinais parkinsonianos de bradicinesia (movimentos lentos). Os animais de 2 dias não apresentaram diferenças em nenhum dos parâmetros locomotores analisados, em nenhuma das doses de PQ, quando comparados aos controles. As reduções de sobrevivência e locomoção provavelmente induzidas pelo tratamento agudo com PQ não estão associados à alterações ultraestruturais mitocondriais e musculares, uma vez que em todos parâmetros avaliados nas imagens de MET (densidade, porcentagem de área coberta, área e coeficiente de forma "Shape Z"), não foram encontradas diferenças em relação aos controles, em ambas as doses e idades avaliadas (Controle e PQ50mM; 2 e 15 dias de idade). Sendo assim, este estudo demonstra que o tratamento com PQ é mais nocivo, ao menos em relação à sobrevivência e a locomoção, em indivíduos maduros (15 dias de idade) quando comparados a indivíduos jovens (2 dias de idade). Além disso, o tratamento agudo com PQ não produz diferenças ultraestruturais em fibras musculares e mitocôndrias, como é descrito na literatura em mutantes de *D. melanogaster* com DP familiar, como *PINK1* e *parkin*.

**Palavras-chave:** Parkinson; Paraquat; Mitocôndria; MET; *Drosophila melanogaster*.

## ABSTRACT

In humans, Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative process that can occur sporadically, familial or associated with environmental factors, as pesticides exposure like Paraquat (PQ). Fruit fly, *Drosophila melanogaster*, has been widely used as a biological model for study of familial PD, involving mutants for genes overexpression or null genes, as well as studies of parkinsonism produced by inducing agents, as PQ. Although there are many studies on neuronal effects of PQ in *D. melanogaster*, there is scarce research on the effects of PQ on the muscular and mitochondrial ultrastructure of *D. melanogaster*, neither its effects on survival and locomotion parameters, at different ages, in this same biological model. Thus, the goal of present study was to evaluate survival, locomotion and ultrastructural parameters of mitochondrial and muscular fibers, using a 48 hour survival curve; open field test, evaluated by Anymaze software; and transmission electron microscopy (TEM) associated to planar morphometry and stereology techniques, in 2 and 15-days-old *D. melanogaster*, treated with different PQ doses (0 - control, 10, 50, 100, 150 and 200mM), diluted in medium. We observed that PQ has a higher lethality in 15-days-old flies, with 20% mortality in PQ10mM, 60% in PQ50mM and 100% in doses above PQ100mM. In 2-days-old flies, a 20% mortality can be observed, only at PQ150mM dose, and PQ200mM presents as a lethal dose, in both groups. Regarding locomotion, in 15-days-old animals, PQ10mM and PQ50mM doses induce a significant reduction in the following locomotor parameters: distance travelled, average speed and average speed in mobile time ( $p < 0.05$ ), indicating parkinsonian signs of bradykinesia (slow movements). The 2-days-old animals showed no differences in any of the locomotor parameters analyzed, in any PQ doses, when compared to controls. Reductions in survival and locomotion probably induced by acute treatment with PQ are not associated with ultrastructural changes in mitochondrial and muscular, since in all parameters evaluated in TEM images (density, percentage of area covered, area and shape coefficient "Shape Z"), no differences were found regarding to controls, in both doses and ages evaluated (Control and PQ50mM; 2 and 15-days-old). Thus, this study demonstrates that treatment with PQ is more harmful, at least concerning survival and locomotion, in mature individuals (15-days-old) when compared to young individuals (2-days-old). Furthermore, PQ acute treatment did not cause ultrastructural differences in muscle fibers and mitochondria, as previously described in the literature in *D. melanogaster* mutants with familial PD, as *PINK1* and *parkin*.

**Keywords:** Parkinson; Paraquat; Mitochondria; TEM; *Drosophila melanogaster*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

### DISSERTAÇÃO

- Figura 1** - Corte transversal de um encéfalo humano apresentando a Substância nigra *pars compacta* (SNpc) de um indivíduo saudável e um indivíduo acometido pela Doença de Parkinson (DP). ..... 15
- Figura 2** - Fórmulas estruturais do MPTP, MPP+ e paraquat (PQ). ..... 20
- Figura 3** - O tórax de *D. melanogaster* e seus músculos indiretos de vôo. À esquerda, os músculos dorso-longitudinais (MDL); à direita, os músculos dorso-ventrais (MDV). O desenho (inferior) mostra uma secção transversal através do tórax com músculos dorso-ventrais (MDV) e músculos dorso-longitudinais (MDL) indicados. .... 26

### ARTIGO CIENTÍFICO

- Table 1** - Experimental groups and number of flies used in each analysis for each age group. .... 49
- Figure 1** - Survival Curve of 2 and 15-days-old *D. melanogaster* exposed to different paraquat (PQ) doses: 0 (control) 10, 50, 100, 150 and 200 mM, for 48 hours. .... 50
- Figure 2** - Exploratory locomotion evaluation in 2 and 15-days-old *D. melanogaster*. In the graph are depicted data from control and surviving flies from both 2 and 15-days-old flies exposed to different paraquat (PQ) doses: 10, 50, 100, 150 and 200 mM, for 48 hours. In between groups statistical analysis demonstrated no significant differences when analyzing 2-days-old *D. melanogaster*, in all treatments used. Regarding 15-days-old *D. melanogaster* treated with PQ, in between groups analysis indicate a significant decrease in distance travelled, average speed and average speed in mobile time as higher the PQ dose exposition (2A; 2B and 2D). Which was also true when comparing exploratory locomotion between different PQ doses taking into account ages: 15-days-old flies also present significant reduced distance travelled, average speed and average speed in mobile time as higher the PQ dose exposition (2A; 2B and 2D). Two-way ANOVA-Tukey test. Data is presented as mean  $\pm$  s.e.m. \*  $p < 0,05$ . .... 51

**Figure 3** - Basal locomotor evaluation in 2 and 15-days-old *D. melanogaster*. In the graph are depicted data from control and surviving flies exposed to different concentrations of paraquat (PQ): 10, 50, 100, 150 and 200 mM, for 48 hours. In between groups statistical analysis demonstrated no significant differences when analyzing 2-days-old *D. melanogaster*, in all treatments used. Regarding 15-days-old *D. melanogaster* treated with PQ, analysis comparing different doses indicate a significant decrease in distance travelled, average speed and average speed in mobile time as higher the PQ dose exposition (3A; 3B and 3D). Considering mobile time, it was also significantly reduced when compared to control, however, PQ dose apparently not influenced this parameter (3C). The same was observed when comparing basal locomotion between different PQ doses taking into account ages: 15-days-old flies also present significant reduced distance travelled, average speed and mobile time (3A; 3B and 3C). No significant differences were observed when comparing different PQ doses between 2 and 15-days-old flies (3D). Two-way ANOVA-Tukey test. Data is presented as mean  $\pm$  s.e.m. \*  $p < 0,05$ . .....52

**Figure 4** - Morphological, morphometric and stereological evaluation of transmission electron microscopy (TEM) images obtained from Indirect Flight Muscles (IFMs) of both control *D. melanogaster* and treated with paraquat (PQ) 50 mM dose in different ages, 2 and 1 No qualitative or quantitative differences were found in all analyzed parameters from mitochondria and muscle fibers: density, percentage of area covered, area and shape Z. A= TEM images depicting mitochondria and muscle fibers; green arrows indicates muscle fibers, while red arrows points to mitochondria; B= Mitochondrial parameters; C= Muscular parameters. Two-way ANOVA - Tukey test. Data is presented as mean  $\pm$  s.e.m. Calibration bar= 2  $\mu$ m.....53

## LISTA DE SIGLAS

<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>CTE</b>	Cadeia de Transporte de Elétrons
<b>DAT</b>	Transportadores de Dopamina
<b>DP</b>	Doença de Parkinson
<b>DTT</b>	Depressor Tergal do Trocânter
<b>ERO</b>	Espécies Reativas à Oxigênio
<b>MDL</b>	Músculos Dorso-Longitudinais
<b>MDV</b>	Músculos Dorso-Ventrais
<b>MIV</b>	Músculos Indiretos de Vôo
<b>MOA</b>	Monoamino oxidase
<b>MPP<sup>+</sup></b>	1-metil-4-fenilpiridina
<b>MPTP</b>	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PQ</b>	Paraquat
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SNpc</b>	Substância <i>nigra pars Compacta</i>

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1	DOENÇA DE PARKINSON	14
1.1.1	Disfunções mitocondriais na doença de Parkinson	16
1.1.2	Alterações musculares na doença de Parkinson	18
1.2	O PARAQUAT E O PARKINSONISMO	19
1.2.1	O paraquat e a disfunção mitocondrial	21
1.3	<i>Drosophila melanogaster</i> COMO MODELO ANIMAL PARA O PARKINSONISMO	23
1.3.1	Degeneração muscular em <i>D. melanogaster</i>	25
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29

### CAPÍTULO II

<b>3</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b>	<b>31</b>
----------	--------------------------	-----------

### CAPÍTULO III

<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>57</b>
	REFERÊNCIAS	58
	ANEXO A – CARTA DE ACEITE DA COMISSÃO CIENTÍFICA	67
	ANEXO B – ARTIGOS PUBLICADOS NO PERÍODO DO MESTRADO	68

# **CAPÍTULO I**

Introdução

Objetivos



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) é caracterizada como uma doença neurodegenerativa progressiva, sendo um dos distúrbios do movimento mais frequentes e debilitantes, usualmente relacionados à idade (1–3). Devido a patogênese e manifestações clínicas variadas, que são resultantes de interações complexas entre os fatores de susceptibilidade e o processo de envelhecimento (2), recentemente a DP tem sido denominada por alguns membros da comunidade científica como a “Quimera do Parkinson”, sendo, portanto, de vital importância aprimorar o conhecimento básico sobre essa doença e suas variáveis (4).

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum em todo mundo, sendo que a de maior incidência e prevalência é a doença de Alzheimer (5,6). A DP é diagnosticada em todos os grupos étnicos, contudo, apresenta diferenças geográficas em relação à sua prevalência, sendo mais comum em países desenvolvidos onde os índices de longevidade populacional são elevados (7). Aproximadamente 1 a 2% da população mundial acima de 65 anos desenvolve DP, tendo um aumento desta prevalência para 3 a 5% quando os pacientes apresentam 85 anos ou mais e, baseando-se no crescimento esperado da população com mais de 65 anos, existe uma estimativa para a duplicação do número de pacientes com DP de 2005 até 2030(8).

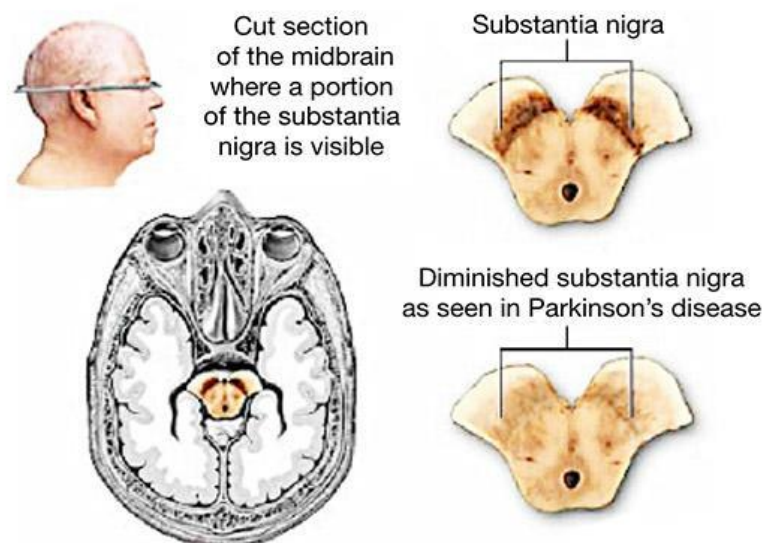
A DP foi descrita primeiramente pelo médico inglês James Parkinson, em 1817(9). Contudo, uma melhor compreensão dos princípios anatômicos e fisiológicos da doença ocorreram apenas em 1958, com a definição do sistema nigro-estriatal de transmissão dopaminérgica. Na década de 1960 foi demonstrado que, após a perda de 70-80% dos neurônios dopaminérgicos da via nigro-estriatal, os principais sintomas motores da patologia podem ser claramente detectados em exames clínicos (10).

A DP é caracterizada neuropatologicamente pela perda de células nigro-estriatais e pela presença de precipitados proteicos, citoplasmáticos e com acúmulo de  *$\alpha$ -sinucleína*, denominados corpos de Lewy (11,12). A neurodegeneração dopaminérgica da substância *nigra pars compacta* (SNpc) (Fig. 1) resulta em um déficit importante de dopamina no estriado e, desta forma, a DP é clinicamente diagnosticada por apresentar disfunções motoras, como tremores de repouso e em

movimento, acinesia (dificuldade de iniciar movimentos), bradicinesia (movimentos lentos), rigidez e instabilidade postural (13–15).

Estudos sobre a neurodegeneração na DP sugerem determinadas características da doença. Primeiramente, a perda de neurônios dopaminérgicos associada à DP, que possui uma característica topológica diferente do padrão visto durante o envelhecimento normal. Indivíduos com DP apresentam perda celular concentrada nas porções ventrolateral e caudal da SNpc, enquanto indivíduos com envelhecimento normal apresentam uma leve perda neuronal na porção dorsomedial da SNpc. Adicionalmente, nos pacientes com DP, é possível a observação de uma drástica redução nos níveis de dopamina no estriado, seus metabólitos – ácidos 3,4-dihidroxifenilacético e homovanílico - , além de uma redução nos receptores dopaminérgico (16,17).

**Figura 1** - Corte transversal de um encéfalo humano demonstrando a substância *nigra pars compacta* (SNpc) de um indivíduo saudável e um indivíduo acometido pela DP.



**Fonte:** Ropper, Samuels, Klein (2014)(18).

Embora a maioria dos sintomas motores da DP estejam relacionados à neurodegeneração dopaminérgica na SNpc, outros sistemas neurotransmissores sofrem perda neuronal, como o colinérgico e o serotoninérgico, e outras regiões encefálicas também são afetados pela doença, como *locus coeruleus*, substância inominata, núcleos motores dorsais, campo retrorubral, área tegmental ventral, sistema nervoso vegetativo e córtex cerebral. Desse modo, acredita-se que a degeneração não-dopaminérgica seja a principal responsável pela manifestação de

sintomas não-motores da DP, como hiposmia/anosmia (diminuição ou perda total do olfato), constipação, impotência sexual, declínio cognitivo, ansiedade, depressão e distúrbios do sono, sendo que alguns destes sintomas estão presentes antes mesmo do surgimento das dificuldades motoras (17,19,20).

Apesar de possuir uma etiologia desconhecida, foram evidenciadas diferenças no risco do desenvolvimento da doença mediante variantes como o gênero, onde a prevalência da doença é maior em homens, particularmente os de idade mais avançada, e essa diferença entre gêneros pode estar associada aos efeitos neuroprotetores dos hormônios esteróides femininos (21–26). A DP esporádica ou idiopática refere-se à grande maioria dos casos diagnosticados e que não possuem uma causa conhecida (27); a DP familiar e o parkinsonismo familiar são termos utilizados para a descrição de entidades relacionadas a padrões genéticos que induzem a doença e podem ser tanto dominantes quando recessivos, ocorrendo aproximadamente em até 10% dos casos (24,28,29).

### **1.1.1 Disfunções mitocondriais na doença de Parkinson**

Diversos mecanismos estão envolvidos na disfunção mitocondrial na DP. Dentre estes, pode-se citar 1) Proteínas causadoras da doença associadas às formas familiares da DP, que têm demonstrado interagir direta ou indiretamente com mitocôndrias; 2) Anomalias na dinâmica mitocondrial e na sua distribuição intra-neuronal; e 3) Modificações mitocondriais relacionadas ao envelhecimento, como alterações ocorrentes no DNA mitocondrial (28).

As mitocôndrias foram inicialmente implicadas na DP porque o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), cujo subproduto tóxico 1-metil-4-fenilpiridina (MPP<sup>+</sup>), que inibe o complexo I<sup>1</sup> da cadeia de transporte de elétrons (CTE), causa parkinsonismo e neurodegeneração dopaminérgica em usuários dessa droga (29). O modelo de parkinsonismo foi, então, aprimorado em animais, nos quais o tratamento com rotenona – outro composto inibidor do complexo I –(30) ou com o MPTP(31) resultam em um fenótipo parkinsoniano, apresentando degeneração dos neurônios

---

<sup>1</sup> O complexo I é um componente da cadeia respiratória mitocondrial relacionado à fosforilação oxidativa.

dopaminérgicos da SNpc. Ao que tudo indica, o mecanismo de toxicidade nesses modelos de inibição do complexo I mitocondrial envolve estresse oxidativo (30-32).

Estudos demonstram que muitos dos genes que são associados à DP também envolvem as mitocôndrias na patogênese desta doença, nesse sentido, os genes nucleares *α-sinucleína*, *parkin*, *DJ-1*, *PINK1*, vem sendo estudados intensamente (33–38). Por outro lado, são poucos os casos em que a DP é associada a mutações hereditárias de DNA mitocondrial(39).

Mutações ocorrentes no gene da *α-sinucleína* estão associadas à DP familiar autossômica dominante. A *α-sinucleína* apresenta-se como o componente principal dos corpos de Lewy, e, aparentemente, o efeito primário das mutações de *α-sinucleína* é uma formação expandida de agregados oligoméricos ou fibrilares (40). Contudo, parece haver uma correlação entre o acúmulo ou degradação anormal de proteínas, a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo. Em camundongos transgênicos, por exemplo, a superexpressão de *α-sinucleína* prejudica a função mitocondrial(40). A utilização de camundongos com superexpressão de *α-sinucleína* mutante A53T demonstrou que as mitocôndrias degeneradas foram imunocoradas para *α-sinucleína*, o que leva a possibilidade de que a *α-sinucleína* mutante possa danificar diretamente as mitocôndrias(41).

A mutação no gene *parkin* é associada com a DP juvenil autossômica recessiva, uma vez que *parkin* codifica a proteína ubiquitina E3 ligase, uma mutação nesse gene induz anormalidades no sistema ubiquitina-proteassoma. Posto que, existam inter-relações entre o funcionamento anormal do sistema ubiquitina-proteassoma, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, a deficiência de *parkin* ou mutações deste gene levam ao estresse oxidativo e à disfunção mitocondrial, visto que *parkin* pode associar-se com a membrana mitocondrial externa e prevenir o edema mitocondrial, a liberação do citocromo *c* e a ativação da caspase, assim, esse efeito de proteção acaba sendo anulado pelos inibidores de proteassoma e pela mutação de *parkin*(42). Este gene também foi localizado nas mitocôndrias de células em proliferação, onde demonstrou-se uma associação ao fator de transcrição mitocondrial A e o aumento da biogênese mitocondrial (43). Ademais, a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo também podem afetar a função de *parkin* e exacerbar suas mutações(44).

Mutações ocorrentes no gene *DJ-1* também estão associadas à DP juvenil autossômica recessiva(45). Estudos demonstram que o *DJ-1* realiza interações com

a  $\alpha$ -sinucleína(46), *parkin* e *PINK1*(46,47). Em geral, a função de *DJ-1* aparenta ser a proteção contra a morte celular, especialmente as que são induzidas pelo estresse oxidativo. Este gene também pode atuar como um sensor redox, ou seja, o estresse oxidativo faz com que um resíduo de cisteína crítico (C106) seja acidificado, o que leva à sua realocização às mitocôndrias, mutações C106 impossibilitam essa realocização mitocondrial, o que acaba por prejudicar a resposta celular ao estresse oxidativo e ao dano mitocondrial(33). A deficiência de *DJ-1*, em camundongos, causa hipersensibilidade ao MTPT e ao estresse oxidativo(48).

Assim como os dois genes anteriores, *PINK1* também representa uma terceira forma de DP juvenil autossômica recessiva(49). Pacientes com mutação em *PINK1* apresentam sintomas clinicamente idênticos aos de pacientes com formas esporádicas de DP(29). Este gene é localizado na mitocôndria(34), apresentando-se como uma quinase e, assim como a *DJ-1*, parece atuar na proteção contra a morte celular(50).

Um ponto que deve ser ressaltado é que, embora a ciência tenha avançado no entendimento das alterações mitocondriais neuronais relacionadas aos diferentes tipos de parkinsonismo, brevemente descritas anteriormente, ainda pouco se sabe sobre as alterações mitocondriais musculares inerentes à essa doença, tanto no âmbito ultraestrutural quanto metabólico.

### **1.1.2 Alterações musculares na doença de Parkinson**

Uma função essencial dos músculos, principalmente os estriados esqueléticos, é a função motora, contudo, os músculos possuem atribuições fundamentais na manutenção da homeostase, incluindo controle de temperatura e metabolismo sistêmico, fornecendo a principal reserva de aminoácidos do corpo. Como todo organismo, os músculos são vulneráveis a uma série de doenças sistêmicas, além de processos catabólicos, inflamatórios, imunológicos, endócrinos e metabólicos, conseqüentemente, alterações na estrutura e função musculares geradas por esses processos podem afetar a função motora (51–53).

A compreensão sobre o modo como a DP altera de modo significativo a musculatura estriada esquelética, passa obrigatoriamente pelo entendimento de que essa doença afeta de modo relevante as vias neurais responsáveis pelo controle de postura e movimento, principalmente as vias mesencefálicas, resultando em uma

alteração crônica significativa do lançamento de acetilcolina na junção neuromuscular, alterando não somente a contração muscular, através dos receptores nicotínicos, mas também o metabolismo muscular, desse modo, observa-se que os pacientes com DP apresentam perda de massa muscular, fadiga e resistência ao exercício (54).

Embora os mecanismos celulares e moleculares do fenótipo da musculatura estriada esquelética na DP ainda não estejam bem descritos, algumas hipóteses, com participação mitocondrial, são aventadas. Nesse sentido, é importante recordarmos que os músculos estriados esqueléticos também têm a função de manter o metabolismo energético do organismo, oxidando glicose e ácidos graxos nas mitocôndrias. Desse modo, manter a saúde mitocondrial é vital para um metabolismo energético normal e também para a preservação do músculo esquelético (55,56).

Em condições de desuso muscular e em resposta à doença crônica, a massa muscular esquelética perde-se através de um processo conhecido como atrofia do músculo esquelético. Estudos demonstraram que a perda de musculatura esquelética é associada com a ação do sistema de ubiquitina-proteassoma e ligases E3 músculo-específicas (57,58). Além da ubiquitinação de proteínas intracelulares, a disfunção mitocondrial também é vista durante condições de desgaste muscular (55). Estudos também relatam anormalidades mitocondriais durante a perda de massa muscular relacionada ao envelhecimento (59,60) e atrofia por desuso (61).

Corroborando com a associação entre DP e perda muscular, um estudo prévio demonstrou que, em camundongos, a ausência do gene *parkin* – anteriormente descrito como um dos genes envolvidos com a DP familiar juvenil autossômica recessiva – resulta em redução da massa corporal, diminuição da massa muscular esquelética e atrofia das fibras musculares (62). Embora os efeitos da DP familiar na musculatura comecem a ser abordados na literatura, até o presente momento, pouco se sabe sobre os efeitos, agudos ou crônicos, dos agentes indutores de parkinsonismo como o PQ, sobre a musculatura estriada esquelética.

## 1.2 O PARAQUAT E O PARKINSONISMO

O parkinsonismo está associada à inúmeros fatores de risco ambientais, seja na modulação da doença ou em sua progressão. Foi comprovado, através de dados de estudos epidemiológicos, que existe uma associação entre o aumento no risco do

desenvolvimento de parkinsonismo em humanos e determinados fatores ambientais, entre estes, a exposição a agrotóxicos como o paraquat (PQ)(63–65).

O PQ, do grupo químico biperidílio, é um herbicida de amplo espectro e, embora tenha sido proibido em 32 países por restrições substanciais, continua sendo amplamente utilizando no mundo inteiro (66). É considerado não seletivo e de rápida ação, sendo registrado para o controle de pragas em culturas como milho, algodão, soja, maçã, cana-de-açúcar, entre outras (67), inclusive no Brasil (68). O PQ é capaz de induzir lesões associadas ao parkinsonismo em animais, como ratos e determinadas linhagens de camundongos, através de mecanismos neurodegenerativos direta ou indiretamente relacionados a espécies reativas a oxigênio (ERO)<sup>2</sup> (69).

O PQ possui uma estrutura semelhante com o MPP<sup>+</sup> (2) (Fig. 2), um subproduto tóxico, gerado a partir da oxidação da MPTP, que tem grande facilidade de ultrapassar a barreira hematoencefálica devido sua alta lipofilicidade. A oxidação de MPTP em MPP<sup>+</sup> ocorre através da enzima monoamino oxidase (MAO), no sistema nervoso central (SNC) (70). A MPP<sup>+</sup> tem a capacidade de ser transportada aos neurônios dopaminérgicos pelos transportadores de dopamina (DAT), provocando a morte de tais neurônios (63). Devido à grande semelhança estrutural entre a MPP<sup>+</sup> e vários pesticidas como o PQ, correlaciona-se a exposição a esses pesticidas e o desenvolvimento de parkinsonismo (63,71–73).

**Figura 2** - Fórmulas estruturais do MPTP, MPP<sup>+</sup> e paraquat.



**Fonte:** Ayala, Andérica-Romero, Pedraza-Chaverri (2014)(74)

<sup>2</sup> ERO são moléculas instáveis e extremamente reativas, capazes de transformar outras moléculas com as quais colidem. As ERO são geradas em grande quantidade durante o estresse oxidativo.

Durante muitos anos acreditou-se que o PQ não era capaz de alcançar o SNC com a mesma eficácia do MPTP (75), pelo fato de se tratar de uma molécula dicatiônica hidrofílica, de baixo coeficiente de partição e pela dificuldade de atravessar membranas (70). Contudo, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o PQ tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica através da ação de transportadores de aminoácidos neutros, como por exemplo o sistema aminoácido transportador tipo L-1 L (LAT-1) (63,76,77), induzindo, assim, a neurodegeneração dopaminérgica (69). O PQ exerce seu efeito deletério nesses neurônios de uma maneira única, comparando-se ao MPP<sup>+</sup> (78). Em relação ao mecanismo de transporte do PQ aos neurônios dopaminérgicos, o entendimento parece controverso; sendo descrito um não envolvimento do DAT, diferentemente do que ocorre com o MPTP (79).

Em ratos, a administração sistêmica repetida de baixas doses de PQ, via intraperitoneal, leva à origem de ERO no encéfalo, o que pode acabar por desencadear processos neurodegenerativos progressivos e lentos. Foi evidenciado também que a exposição sistêmica subcrônica ao PQ, tem a capacidade de provocar mudanças degenerativas em neurônios, principalmente uma perda significativa de neurônios dopaminérgicos da SNpc. Esses resultados foram comprovados através da contagem do número total de células coradas pelo método de Nissl na SNpc e da análise estereológica do número de neurônios tirosina-hidroxilase imunorreativos nesta mesma região encefálica (80).

### **1.2.1 O paraquat e a disfunção mitocondrial**

Sendo a principal organela envolvida na respiração celular, a mitocôndria é responsável pela geração de ERO induzida por PQ em encéfalo de ratos (78). O PQ possui a capacidade de atravessar as membranas dos neurônios dopaminérgicos e de acumular-se nas mitocôndrias, assim, acarreta alterações no complexo I da CTE (28), o que prejudica a geração de um gradiente de prótons ao longo da membrana mitocondrial interna, afetando negativamente a geração de adenosina trifosfato (ATP) (81), além da geração de ERO. Esses dados são comprovados através de estudos que demonstram, em neurônios dopaminérgicos da SNpc, um bloqueio no complexo I mitocondrial em modelos experimentais de parkinsonismo (28).



O complexo I é caracterizado como o principal local para a entrada de elétrons na CTE(82,83). Para ser uma cadeia respiratória funcional, é necessária a geração de um gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna, explorada em uma etapa subsequente pelas ATPases mitocondriais para gerar ATP (84,85). Distúrbios na transferência de elétrons através do complexo I levam à uma degradação do gradiente de prótons e, conseqüentemente reduzem a geração de ATP. Com a limitação da disponibilidade de ATP, a homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial é perturbada, - visto que as mitocôndrias são envolvidas na regulação homeostática de  $\text{Ca}^{2+}$  - contribuindo assim para a disfunção mitocondrial(86,87). Paralelamente à redução na geração de ATP, o bloqueio do fluxo de elétrons ao longo da cadeia respiratória resulta em uma redução de oxigênio molecular, gerando o radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )(85). Níveis elevados de ERO promovem o dano oxidativo do DNA, proteínas e lipídios mitocondriais e desencadeiam a fragmentação mitocondrial(88,89). A perda do potencial transmembrana mitocondrial, diminuição da produção de ATP mitocondrial, distúrbios no  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial homeostático, assim como a produção de níveis nocivos de ERO são características coletivamente referidas como disfunção mitocondrial(90).

Hosamani e col (2013), usando *Drosophila melanogaster* como modelo de estudo, demonstraram que o PQ induz estresse oxidativo em mitocôndrias. A exposição aguda ao herbicida acarretou um aumento acentuado de malondialdeído – um marcador de estresse oxidativo – em 43%, além de níveis de ERO em 27% nas mitocôndrias. O mesmo estudo evidenciou que a exposição ao PQ produziu uma redução significativa na atividade enzimática do complexo I mitocondrial, em concentrações mais elevadas. O potencial de membrana também foi verificado, por ser um dos indicadores de integridade mitocondrial, quando os resultados demonstram uma diminuição do potencial de membrana, conseqüentemente há uma redução da integridade mitocondrial, no entanto, neste estudo, foi evidenciado que o PQ aumentou o potencial de membrana - o que mostra que a integridade mitocondrial não foi danificada-, contudo, os resultados de estresse oxidativo mantiveram-se (91). Dessa forma, esse resultado especula que a alteração do potencial de membrana pode facilitar a captação de PQ nas mitocôndrias (92).

### 1.3 *Drosophila melanogaster* COMO MODELO ANIMAL PARA O PARKINSONISMO

Apesar de possuir um SNC menos complexo que o humano, *D. melanogaster*, conhecida popularmente como “mosca das frutas”, compartilha inúmeros genes em comum com humanos, além de apresentarem a conservação de vias metabólicas e sinalizadoras à nível celular. Este grupo tem sido empregado frequentemente como modelos animais que mimetizam doenças humanas neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e a DP (93–96).

A *D. melanogaster* se apresenta como um sistema biológico simples, porém valioso para estudos *in vivo*, sendo considerado como uma ferramenta importante para o estudo de fatores genéticos relacionados à patologia da DP (97,98). Por serem organismos invertebrados de pequeno porte, o uso de *D. melanogaster* torna-se vantajoso, devido ao seu tamanho reduzido, ciclo de vida curto, dimorfismo sexual, grande fecundidade, número reduzido de cromossomos e genoma relativamente pequeno quando comparado ao de ratos ou humanos. Além disso, são de fácil cultivo em laboratório e possuem poucas exigências nutricionais, além do baixo custo de manutenção (99,100).

Apesar de possuírem uma distribuição de neurônios dopaminérgicos no SNC de forma diferente do sistema nervoso de vertebrados, *D. melanogaster* demonstra similaridade de diversos recursos celulares e moleculares para funcionamento e desenvolvimento neuronal (101). Já foi confirmado que o cérebro de indivíduos adultos de *D. melanogaster* possui grupos neuronais de neurônios dopaminérgicos distintos, e compartilha os mesmos sistemas de neurotransmissores de humanos, GABA, glutamato, dopamina, serotonina ou acetilcolina, sendo capazes de realizar comportamentos complexos que reproduzem alguns comportamentos humanos dependentes de neurônios dopaminérgicos (97). O sequenciamento do genoma de *D. melanogaster* revelou a homologia de cinco dos seis genes que são relacionados à DP em humanos (101).

Mutações dominantes nos genes  $\alpha$ -sinucleína e *LRRK2/dardarin* e recessivas nos genes *parkin*, *DJ-1* e *PINK1* são diretamente associadas à forma familiar rara da DP. Dentre esses genes,  $\alpha$ -sinucleína, *parkin* e *DJ-1* vem sendo estudados de forma intensiva (50,102–109). Modelos *in vivo* e *in vitro* apresentando mutações desses genes demonstram prejuízos na estrutura e função mitocondrial e em respostas à

estresse oxidativo, assim, reforçam o envolvimento desses fatores na patogênese da DP (110).

A expressão de  $\alpha$ -sinucleína em *D. melanogaster* tem a capacidade de provocar a perda dos neurônios dopaminérgicos em moscas adultas, inclusões de filamentos intraneuronais contendo  $\alpha$ -sinucleína além de disfunção motora, o que remete claramente as características mais comuns da DP de humanos (111).

Vias de estresse oxidativo aparentemente exercem uma função direta na patogênese envolvendo o gene *parkin* em *D. melanogaster* (112). Além disso, esses mutantes também apresentam uma degeneração de neurônios dopaminérgicos em determinados *clusters* (caracterizam-se por pequenos agrupamentos dessas células no sistema nervoso da *D. melanogaster* adulta) e uma redução significativa do conteúdo dopaminérgico no cérebro. A *D. melanogaster*, quando possui o gene *parkin* mutante, apresenta uma maior sensibilidade à toxicidade do PQ, quando exposta ao meio alimentar contendo o pesticida (113).

Homólogo ao gene *DJ1* humano, o gene *DJ1a* em *D. melanogaster* possui um papel importante na manutenção neuronal e na resposta ao estresse oxidativo. Quando *DJ1a* tem sua função inibida, resulta em um acúmulo celular de ERO, além de apresentar uma hipersensibilidade do organismo ao estresse oxidativo e disfunção e degeneração de neurônios dopaminérgicos e fotorreceptores(114). Além disso, em moscas, o *DJ-1* sofre inativação oxidativa progressiva com o envelhecimento, que, por sua vez, aumenta a sensibilidade ao estresse oxidativo, e poderia fornecer uma explicação potencial para a dependência da idade de PD esporádicos(46). Também foi demonstrado que mutantes *DJ1b* (também homólogo ao gene humano *DJ1* apresenta uma maior sensibilidade ao PQ, com redução na habilidade de escalada quando relacionadas às moscas selvagens (controle) também expostas ao herbicida (115).

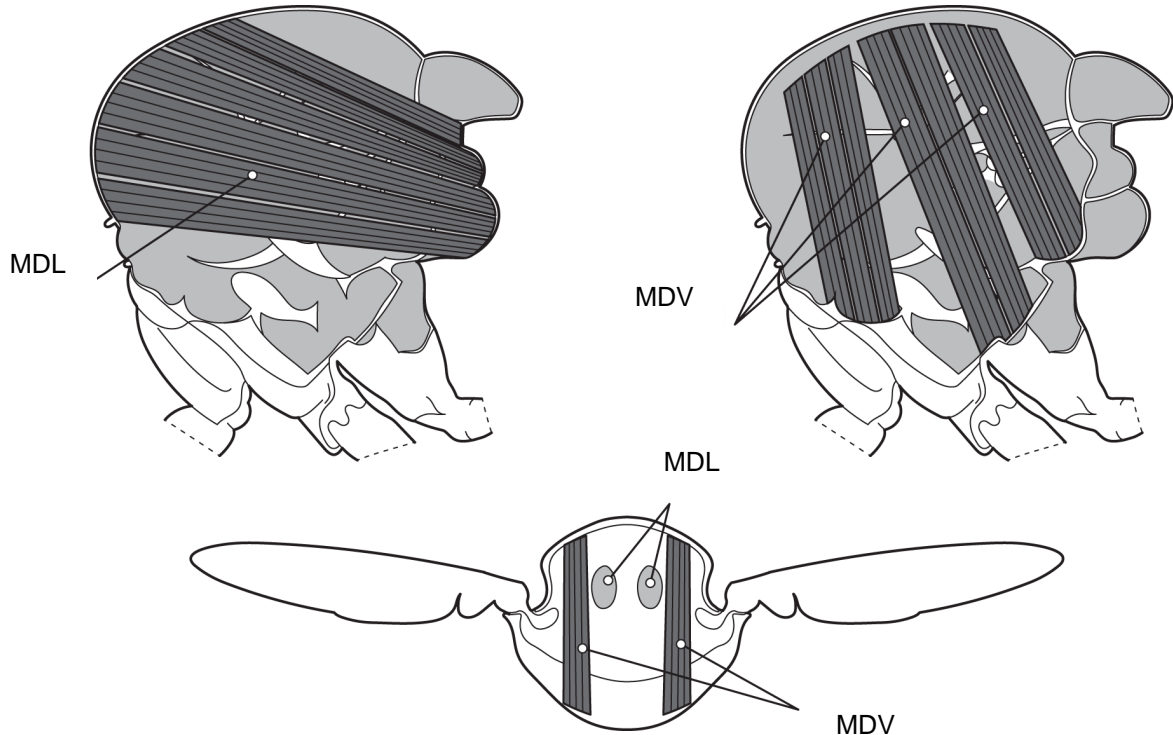
O aumento das concentrações de PQ em meios de cultivo contendo *D. melanogaster* apresenta uma correlação negativa em relação à expressão do Gene *parkin* relacionado à DP (116). Além disso, em indivíduo adultos *D. melanogaster*, o PQ prejudica a atividade locomotora e reduz os índices de sobrevivência (117). O PQ também induz à perda seletiva de *clusters* de neurônios dopaminérgicos, gerando, assim, alterações motoras típicas do parkinsonismo como tremores, instabilidade postural, bradicinesia e comportamentos rotacionais, semelhante à certas características comportamentais associadas à DP (118).

### 1.3.1 Degeneração muscular em *D. melanogaster*

A degeneração muscular em *D. melanogaster* é tema de diversos estudos (104–106,119–121). Indivíduos apresentando o gene *parkin* de forma nula têm um fenótipo de asa virada para baixo, onde os mutantes têm as asas em um ângulo aproximadamente de 45° enquanto os indivíduos selvagens mantêm suas asas paralelas ao solo (119). Nesses mutantes, as moscas em seu primeiro dia de vida exibem postura normal das asas, e, aos 10 dias de idade, mais de 70% mostram-se com o fenótipo mencionado, evidenciando que a degeneração tem uma correlação positiva com a progressão de idade, embora os indivíduos dessa linhagem mutante não apresentem alterações na sua sobrevivência e capacidade de nadar, esses apresentam defeitos graves tanto na capacidade de voo quanto de subida (119,120).

A musculatura de voo das moscas é separada de forma anatômica e fisiológica em dois grupos funcionalmente distintos. A maior parte do volume torácico é preenchida com músculos de voo indiretos (MIV), que geram forças mecânicas elevadas, necessárias para o voo. Apesar desses músculos possuírem um papel críticos na condução de movimento das asas, estes não se inserem diretamente na base da asa, mas sim às cutículas, cuja deformação age como uma espécie de “dobradiça”, fazendo com que as asas se movam. Os MIV são divididos em dois grupos, que são conjuntos antagonistas de músculos que correm de frente para trás – os músculos dorso–longitudinais (MDL), compostos por 12 fibras musculares – e de cima para baixo – os músculos dorso-ventrais (MDV), compostos por 14 fibras musculares -, localizados dentro do tórax(122) (Fig 3). Um sistema complexo de acoplamento mecânico dentro do exoesqueleto do tórax desses animais transforma pequenas tenções geradas pelos MIV no grande movimento de varredura das asas (123).

**Figura 3** - O tórax de *D. melanogaster* e seus músculos indiretos de voo. À esquerda, os músculos dorso-longitudinais (MDL); à direita, os músculos dorso-ventrais (MDV). O desenho (inferior) mostra uma secção transversal através do tórax com músculos dorso-ventrais (MDV) e músculos dorso-longitudinais (MDL) indicados.



**Fonte:** Hedenström (2014)(122).

Análises histológicas dos principais MIV e da probóscide de *D. melanogaster* apresentando o gene *parkin* nulo revelaram uma ruptura severa da integridade muscular nesses animais a qual estaria relacionada à uma diminuição do número de miofibrilas, além de desintegração da matriz e inchaço mitocondrial. A superexpressão de *parkin* é capaz de restaurar essas alterações morfológicas, indicando que as alterações mitocondriais constituem um indicador precoce de disfunção muscular e que a patologia muscular desses animais apresenta natureza degenerativa (120). Contudo, as alterações descritas nesses mutantes parecem ser músculo-específicas, uma vez que músculos envolvidos no salto, como o depressor tergal do trocânter (DTT), apresentaram-se morfológica e funcionalmente normais (120).

O DTT é um músculo usado para salto, o que para *D. melanogaster*, é basicamente um prelúdio para o voo. Possuindo uma estrutura diferenciada dos MIV, os DTT apresentam fibras de diâmetro menores e de forma retangular quando vistas em seção transversal, e, além disso, são dispostas em duas camadas. As miofibrilas

são retangulares, com um lado aproximadamente três vezes maior que o outro. Ao contrário dos MIV, os músculos das pernas são, provavelmente, síncronos – ao contrário dos MIV, que são assíncronos -, apresentando impulso nervoso por contração muscular (124). Tanto dados de comportamento quanto de microscopia sustentam a hipótese de que os fenótipos de degeneração muscular ocorrem em apenas alguns grupos musculares específicos (120) e, como esses mutantes possuem uma capacidade nutricional normal, acredita-se que a musculatura lisa não seja afetada significativamente (119).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada para investigar a natureza dos defeitos dos MIV em *D. melanogaster* com gene *parkin* mutante. As fibras musculares do tipo selvagem possuíam uma estrutura altamente regular e uniforme. Em estágio de pupa, as fibras de MIV mutantes da *parkin* exibem morfologia normal e são indistinguíveis dos animais de controle. No entanto, dois dias após a eclosão, os mutantes de *parkin* apresentavam bordas rugosas, espaçamento maior entre os grupos fibrilares e um número reduzido de fibrilas, sugerindo, como dito anteriormente, que a degeneração muscular é progressiva. Os mutantes *parkin* também demonstraram um número reduzido de mitocôndrias, que são geralmente de tamanho menor e variável, com uma perda significativa de cristas. Além disso, sinais de apoptose, incluindo condensação da cromatina e quebra do envelope nuclear, foram observados nos tecidos musculares de *parkin* mutante (119).

Mutantes *PINK1* de *D. melanogaster* também apresentam um modelo de asa modificado. Tanto as fêmeas quanto os machos exibem uma postura de asa retraída ou inclinada, enquanto as moscas controles mantêm suas asas paralelas ao eixo do corpo. Assim como em *parkin*, esse fenótipo progrediu com a idade: 20% das moscas recentemente eclodidas exibiram postura anormal das asas, enquanto aos sete dias de idade, quase 100% delas exibiram este fenótipo. Não foram observados problemas com a caminhada nestes indivíduos, mas sua capacidade de escalar foi bastante reduzida e sua capacidade de voar foi completamente abolida aos 10 dias de idade. Considerando que o voo necessita de um grande consumo de energia, baseado na síntese mitocondrial de ATP e que *PINK1* foi relatado como associado às mitocôndrias, é sugerido que esse gene desempenhe um papel importante na regulação do metabolismo energético e que esta função tem impacto na função de voo e tempo de vida (110).

Assim, *parkin* e *PINK1* podem fazer parte de uma via comum que protege as células contra a morte celular dependente de mitocôndrias e induzida por insultos tóxicos. A morfologia mitocondrial anormal associada à inativação de *parkin* e *PINK1* também sugere a possibilidade de que ambos possam desempenhar papéis fundamentais na regulação da biogênese mitocondrial ou da dinâmica mitocondrial, participando da fusão ou fissão mitocondriais (110,125).

Os MIV de *D. melanogaster* são grupos de músculos especializados, estando constantemente em estado de vibração. Eles exigem um suprimento de oxigênio elevado para que a sua atividade respiratória possa ser sustentada, tornando este tecido especialmente suscetível à disfunção mitocondrial. É possível que a degeneração mitocondrial observada em mutantes *parkin* resulte em um aumento da susceptibilidade aos danos causados pelos radicais de oxigênio, devido ao comprometimento das defesas antioxidantes pelas mitocôndrias, culminando, assim, na morte celular. Esses dados sugerem que a disfunção mitocondrial e os danos dos radicais de oxigênio são dois fatores cruciais no desenvolvimento da DP (119).

As mitocôndrias de MIV de *D. melanogaster* são finas e reticulares durante o desenvolvimento inicial. Durante a fase medial das pupas, quando os sarcômeros estão reunindo-se, as mitocôndrias aumentam de tamanho e adquirem uma forma mais arredondada. É somente durante os estágios finais da pupa que o crescimento hipertrófico dos músculos ocorre (126,127), assim, as mitocôndrias fundem-se para formar as mitocôndrias tubulares grandes. Isso significa que as mudanças de forma e tamanho mitocondriais podem estar correlacionadas com estágios específicos de desenvolvimento de MIV e que a miogênese do MIV é susceptível e possui sensibilidade às alterações de fusão ou regulação mitocondrial. Em MIV adulto, até 40% do volume muscular de vôo é ocupado por grandes mitocôndrias (127,128). Isso reflete as altas taxas metabólicas de oxidação e fosforilação em mitocôndrias de MIVs de *D. melanogaster* que são aproximadamente dez vezes maiores do que músculos esqueléticos humanos (127,129). Desse modo, os MIVs constituem um modelo ideal para investigar a dinâmica mitocondrial no desenvolvimento muscular, em diferentes fases da vida adulta e em doenças (127).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo principal analisar a sobrevivência, a atividade locomotora e a morfologia ultraestrutural das fibras musculares e mitocôndrias de *Drosophila melanogaster* selvagem da linhagem *Canton-S* em diferentes idades exposta ao paraquat (íon 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio dicloreto, Gramoxone® 200, Syngenta) (PQ).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Nos animais dos diferentes grupos experimentais, nossos objetivos específicos foram:

2.1.1 Realizar testes de letalidade, nas diferentes idades e dosagens de PQ.

2.1.2 Avaliar o comportamento locomotor de através do teste de campo aberto, analisando parâmetros de distância percorrida, velocidade média, tempo móvel e velocidade média no tempo móvel;

2.1.3 Com uso de microscopia eletrônica de transmissão, analisar nas fibras musculares e mitocôndrias dos músculos indiretos de voo (MIV) os seguintes parâmetros morfológicos: densidade, porcentagem de área coberta, área e coeficiente de forma (Shape Z).



## **CAPÍTULO II**

Artigo Científico

### 3 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo científico foi submetido ao periódico "*Development*", FI: 5.763, em 30 de janeiro de 2020.

30/01/2020

E-mail de PUCRS - DEVELOP/2020/188946 Manuscript Submission



Paula Fernanda Ribas Neves &lt;paula.ribas@acad.pucrs.br&gt;

---

**DEVELOP/2020/188946 Manuscript Submission**

1 mensagem

**dev@biologists.com** <dev@biologists.com>

30 de janeiro de 2020 15:00

Para: andrea.wieck@edu.pucrs.br

Cc: paula.ribas@acad.pucrs.br, bruna.milanesi@edu.pucrs.br, lisie.paz@acad.pucrs.br, laura.neves@edu.pucrs.br, louise.veiga@edu.pucrs.br, juliana.sulzbach@edu.pucrs.br, rafaela.barboza@edu.pucrs.br, ellen.larissa@edu.pucrs.br, moema.vieira@pucrs.br, pamela.bagatini@yahoo.com.br, regis.mestriner@pucrs.br, llxavier@pucrs.br

MS ID#: DEVELOP/2020/188946

MS TITLE: Very young Drosophila melanogaster are more resistant to Paraquat treatment than mature adults

Dear Dr. Wieck,

This is an automatic message acknowledging the online submission of the above manuscript to Development.

Thank you for your submission.

We take the security of your personal data very seriously. Your details are now stored with our trusted partner BenchPress. We will correspond with you at various stages in the handling of your submitted manuscript and will retain your data in our archive of documents relating to these transactions.

We may also contact you infrequently when we make changes to the journal's processes and policies – only if we genuinely believe they will be of interest and relevance to you as a recent (and hopefully future) author – or to make you aware of opportunities to contribute to a special issue in your field. If any author would prefer not to receive these emails (via our trusted partner MailChimp), just let us know.

We will not send you marketing emails unless you specifically opt in to receive them via our email preference centre (<http://eepurl.com/c7ULfj>) and we will never sell your data on to third parties. Please see our Privacy policy for more details (<http://www.biologists.com/privacy-policy/>).

Best wishes,

Editorial Staff  
Development

-----  
Development  
The Company of Biologists Ltd  
Bidder Building  
Station Road  
Histon, Cambridge, CB24 9LF  
Phone:44 (0)1223 632863  
Fax:44 (0)1223 632875  
[dev@biologists.com](mailto:dev@biologists.com)

The information contained in this message and any attachment is confidential, legally privileged and is intended for the addressee only. Any dissemination, distribution, copying, disclosure or use of this message/attachment or its contents is strictly prohibited and may be unlawful. No contract is intended or implied, unless confirmed by hard copy. If you have received this message in error, please inform the sender and delete it from your mailbox or any other storage mechanism.

The Company Of Biologists Ltd cannot accept liability for any statements made which are clearly the senders' own and not expressly made on behalf of the Company of Biologists Limited or one of their agents.

1/30/2020

History for Andréa Wieck

[PhD Andréa Wieck \(Author\) Queue Summary Reviewer Area](#)

## Submission History for Andréa Wieck

### Found 1 paper

Sort History By:   

Manuscript Id	Current Corr. Author	Date of Original Submission	Current Version Status	Current Editor
DEVELOP/2020/188946	Andrea Wieck	30 Jan 2020	<b>Status:</b> Under Review	Thomas Lecuit
<a href="#">PDF</a> <a href="#">HTML References</a> <a href="#">Source Files</a>	<p><b>Version:1</b></p> <p><b>Title:</b>Very young Drosophila melanogaster are more resistant to Paraquat treatment than mature adults</p> <p><b>Authors:</b>Paula Fernanda Fernanda Ribas Neves, Bruna Milanesi, Lisie Valeria Paz, Laura Tartari Neves, Louise Cordoni da Veiga, juliana henz sulzbach, Rafaela Barboza da Silva, Ellen Larissa de Souza Silva, Moema Queiroz Vieira, Pamela Brambilla Bagatini, Andrea Wieck, Regis Mestriner, and Leder Xavier</p> <p><b>Article Type:</b>Research Article</p> <p><b>Keywords:</b>Drosophila melanogaster; Mitochondria; Paraquat; Parkinson's Disease; TEM</p>			

[\[Top\]](#)[Development](#) [Journal Site](#) [Contact Us](#) [Terms of Use](#) [Privacy Statement](#)

© 2020 The Company of Biologists Ltd

# Very young *Drosophila melanogaster* are more resistant to Paraquat treatment than mature adults

**Running title: Age-related susceptibility to paraquat**

Paula Fernanda Ribas Neves<sup>1,2</sup>, Bruna Bueno Milanese<sup>1</sup>, Lisiê Valéria Paz<sup>1,2</sup>, Laura Tartari Neves<sup>1,2</sup>, Louise Cordoni da Veiga<sup>1</sup>, Juliana Henz Sulzbach<sup>1</sup>, Rafaela Barboza da Silva<sup>1</sup>, Ellen Larissa de Souza Silva<sup>3</sup>, Moema Queiroz Vieira<sup>3</sup>, Pamela Brambilla Bagatini<sup>1</sup>, Andrea Wieck<sup>1,2\*</sup>, Régis Gemerasca Mestriner<sup>1,2</sup>, Léder Leal Xavier<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Escola de Ciências, da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS – Brazil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS – Brazil

<sup>3</sup> Laboratório Central de Microscopia e Microanálise (LabCeMM), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS – Brazil

\*CORRESPONDING AUTHOR

**Andrea Wieck, PhD.**

Laboratório de Biologia Celular e Tecidual  
Escola de Ciências da Saúde e da Vida  
PUCRS  
Avenida Ipiranga, 6681  
Prédio 12, Sala 104  
Porto Alegre, RS, Brasil  
CEP:90619-900  
E-mail: andrea.wieck@edu.pucrs.br  
Telephone: +55 (51) 3320-3545

## ABSTRACT

Muscle mitochondrial dysfunction was described in familial Parkinson's Disease in *Drosophila melanogaster* mutants, affecting survival and locomotion. However, no study showed effects of paraquat-induced (PQ) parkinsonism in *D. melanogaster* regarding muscle, mitochondria and locomotor behavior during different ages. We evaluated survival, locomotion and morphological parameters of mitochondria and muscular fibers using transmission electron microscopy (TEM), in 2 and 15-days-old *D. melanogaster* treated with different PQ doses: control, 10, 50, 100, 150 and 200 mM. PQ treatment was more lethal in 15-days-old *D. melanogaster* with 100% lethality at PQ100 mM. In 2-days-old animals, survival curve was affected at PQ150 mM group, with 20% lethality. Regarding locomotion, PQ treatment only affected 15-days-old *D. melanogaster*, which showed reduced distance travelled, average speed and average speed in mobile time at PQ10 mM and PQ50 mM, indicating bradykinesia. These results probably were not associated to changes in mitochondrial and muscular morphology since no differences were found in all groups studied. Our data indicate pathophysiological differences between PQ-induced parkinsonism and familial parkinsonism in *D. melanogaster* and demonstrate for the first time *D. melanogaster* differential susceptibility to PQ in two developmental stages.

**Keywords:** Paraquat, *Drosophila melanogaster*, TEM, Parkinson Disease, Mitochondria.

## INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder (Greene et al., 2003; Vila et al., 2008; Faivre et al., 2019) characterized by loss of dopaminergic neurons in substantia nigra pars compacta (Teismann et al., 2003; Dickson, 2018; Verma and Ravindranath, 2020), resulting in a significant striatal dopaminergic deficit which generates motor dysfunctions such as tremors, akinesia, bradykinesia, rigidity and postural instability (Deng et al., 2008; Ziviani et al., 2010; Guo, 2012; Verma and Ravindranath, 2020).

The muscular system plays a pivotal role in our lives, controlling temperature, providing energy supply, being essential to locomotion, etc. Consequently, changes in

muscle structure and function are very deleterious to our homeostasis (Falvo et al., 2008; Buford et al., 2010; Romanello and Sandri, 2016). Muscle structure is affected in PD, since PD patients presents impaired motor activities, which are associated with muscle loss, fatigue and decreased resistance to exercise (Burke, 2011). However, the cellular changes behind the skeletal muscle phenotype found in PD patients remain poorly understood (Buford et al., 2013).

One classical model to induce parkinsonism is the exposure to Paraquat (PQ), a largely used herbicide, which has the ability to cross dopaminergic neurons membrane, accumulating in mitochondria, generating damages in the complex I of electron transport chain and consequently leading to neuronal death (Vila et al., 2008; Maitra et al., 2019).

*Drosophila melanogaster* is a widely used animal model to study PD in their different forms as familial PD related to mitochondrial alterations due to shared homologous genes with humans, such as  $\alpha$ -*sinuclein*, *DJ-1*, *PINK1*, *parkin*, *LRRK2* and *VPS35* (Greene et al., 2003; Krüger, 2004; Petit et al., 2005; Park et al., 2006; Clark et al., 2006; Deng et al., 2008; Park et al., 2009; Ziviani, Tao and Whitworth, 2010; Hao et al., 2010; Guo, 2012; Hwang et al., 2013; Klein et al., 2014; Malik et al., 2015; Bardai et al., 2018; Si et al., 2019) or parkinsonism induced by herbicides, as PQ (Hosamani and Muralidhara, 2013).

Motor deficits and a severe muscle integrity disruption, mainly in myofibrils and mitochondria of indirect flight muscles (IFMs), were found in familial PD in *Drosophila* (Greene et al., 2003; Pesah, 2004; Yang et al., 2006; Klein et al., 2014; Si et al., 2019). This reduction in mitochondrial function promoted by PD is also observed in rodents, since, in transgenic mice,  $\alpha$ -*synuclein* overexpression impairs mitochondrial function (Song et al., 2004; Martin, 2006).

Considering PQ-induced parkinsonism in *Drosophila*, it also presents motor dysfunctions similar to those found in PD patients, as akinesia and bradykinesia (Chaudhuri et al., 2007; Bagatini et al., 2011; Hosamani and Muralidhara, 2013), especially in mature animals (more than 10-days-old) (Bagatini et al., 2011; Hosamani and Muralidhara, 2013). However, there are few studies, at least in *D. melanogaster*, regarding the effects of this Parkinson-inductor agent in muscles and their

mitochondria, only through biochemical tests on mitochondria in general (Hosamani and Muralidhara, 2013).

Thus, to clarify some points about this field, our goals were to analyze the effects of different PQ doses in very young (2-days-old) and mature (15-days-old) *D. melanogaster*, analyzing survival and locomotion; and performing an ultrastructural analysis of muscular and mitochondrial morphology using transmission electron microscopy (TEM) associated to planar morphometry and stereology.

## RESULTS

### **15-days-old *D. melanogaster* are more susceptible to PQ acute exposure**

Analyzing the survival curves, it is possible to observe that 2-days-old *D. melanogaster* are more resistant to PQ than 15-days-old, in which as higher the PQ dose, higher the lethality. In 2-days-old flies, PQ10 mM, PQ50 mM and PQ100 mM presents 100% of survival, while PQ150mM dose induce 20% lethality and there are no survivors in PQ200 mM dose (Fig 1A). In 15-days-old, a decreased survival can be observed using lower PQ doses, leading to the following lethality rates PQ10 mM= 20% PQ50 mM= 60% and PQ100, 150 and 200 mM= 100% (Fig 1B).

### **PQ acute treatment affect locomotor behavior only at 15-days-old stage**

Regarding locomotor behavior, no changes were observed in flies at 2-days-old when compared to controls, during both exploratory and basal activity periods in all analyzed parameters (Fig. 2 and 3).

Analyzing 15-days-old animals, PQ10 mM and PQ50 mM doses caused significant reduction in both exploratory and basal activity, when compared to controls (Fig. 2A, B, D and Fig. 3A, B, C, D).

In exploratory locomotion, mature animals treated with PQ10 mM and PQ50 mM showed reduction in locomotion pattern regarding distance travelled, average speed and average speed in mobile time ( $p < 0.05$  in all analyzed parameters) when compared to control group (Fig. 2A, B, D). No changes were observed in mobile time



in 15-days-old animals, in all treatments analyzed (Fig. 2C). Evaluating basal locomotion in 15-days-old flies treated with PQ10 and 50 mM, all parameters showed a significant reduction: distance travelled, average speed, mobile time and average speed in mobile time ( $p < 0.05$  in all analyzed parameters) (Fig. 3).

### **Acute PQ treatment did not affect mitochondria and muscle morphology**

Concerning the planar and stereological quantification of ultrastructural analysis, in 2 and 15-days-old flies treated with PQ, no differences were found in mitochondrial and muscular morphological parameters evaluated in TEM images: density, percentage of area covered, area and shape Z. Additionally, in a qualitative analysis, no signs of muscle or mitochondrial degeneration were found, with both groups showing variable size mitochondria without mitochondrial ridges loss. The IFMs fibers presented normal and identical morphology of control group, with no changes in fibrils patterns or their spacing (Fig. 4).

## **DISCUSSION**

As far as we know, this is the first study describing an increased resistance to PQ promoted by youth in *D. melanogaster*, at least regarding survival and locomotion as shown by our results.

An increased resistance to PQ was described in other studies, however, promoted by other factors, as the three factors presented below.

1- An aging-associated mutation present in *D. methuselah* (*mth<sup>1</sup>*), that prevents dopaminergic neuronal cell death in organisms exposed to PQ, improving locomotor performance (Shukla et al., 2014).

2- Attenuation of PQ effects by exposure to minocycline solution, (a tetracycline drug that appears to have anti-inflammatory properties that mediate neuroprotection in PD animals), this drug increases survival rates and decreases locomotor deficits promoted by PQ (Inamdar et al., 2012)

3-Use of other *D. melanogaster* strain (*Oregon* strain) that resist to high PQ doses (up to 500mM) and long times of PQ exposure, 7 days, presenting locomotor

deficits (abnormal movements in climbing tests, difficulty climbing and tremors), but with no reductions in survival curve (Mehdi and Qamar, 2013).

In fact, we don't know if the "protector effect" found in 2-days-old *D. melanogaster* against PQ treatment share similar metabolic pathways as presented in these three examples of PQ resistance, and it could be an interesting point for future studies.

Another reasonable hypothesis to explain the differences between PQ effects in 2 and 15-days-old *D. melanogaster* could be variation in food intake between flies with different ages, for example: mature *D. melanogaster* could consume more food and, consequently, increase PQ intake than young flies, thus, PQ effects could be more pronounced in mature *D. melanogaster*. Interestingly, in the same direction, a previous study showed that dietary PQ strongly inhibits food intake in flies, as, over a 12 hours period, flies fed with PQ added to the food consumed 75% less than controls (Ja et al., 2007). In fact, it could be considered as a variant of our first hypothesis, in that food intake inhibition promoted by PQ can be different along aging, for example: PQ anorexigenic effect could be more pronounced in 2-days-old *D. melanogaster* when compared to mature flies, thus, less food and PQ would be consumed by young flies and consequently the effects produced by PQ would not be so pronounced leading to the increased survival rate observed in these animals. Unfortunately, there is no data in literature about changes in food intake along aging in *D. melanogaster*. Thus, to estimate the food intake associated to PQ treatment in different ages is the better way to shed some light on this point.

Another point to be considered is the social interactions between genders. In our study, only females were used (since they presents a larger size, making muscle dissection easier) (Swank, 2012). The different *Drosophila* social interaction may influence several behavioral parameters and sleep patterns, even though some studies show no changes in feeding behavior comparing different social interactions (Svetec and Ferveur, 2005; Ganguly-Fitzgerald et al., 2006) However, there is no data correlating different social interactions with different ages in *D. melanogaster*, for example: a different social interaction among females with different ages could result in changes on feeding behavior and consequently different degrees of PQ intoxication.

Our results corroborates with previous findings demonstrating that PQ resistance in wild-type flies decreased significantly during first two weeks of adult life, since 1-days-old flies exposed to PQ for 24 hours presents 95% survival, while 15-days-old flies exposed to PQ for the same time presents only 8% survival. These decrease in PQ resistance probably is associated to increases in DAMB expression levels, a dopamine receptor, which progressively increased over the same period, reaching double in 15-days-old flies (Cassar et al., 2015). Additionally, DAMB mutant flies were surprisingly resistant at all ages, suggesting that DAMB is necessary for toxin sensitivity to aging and oxidative stress induced by PQ. Molecular studies are needed to associate the “DAMB theory” to our results.

Regarding data from TEM analyzes, flies that received PQ50 mM doses showed no significant difference throughout all analyzed parameters when compared to controls. These results are in contrast with findings obtained in familial PD in *Drosophila*, which demonstrated mitochondrial dysfunction by mutations in genes encoding *PINK1* and *parkin* proteins (Greene et al., 2003; Yang et al., 2006; Park et al., 2006; Park et al.; 2009). In humans, sporadic PD presents mitochondrial dysfunction as a well-established pathway for the disease, as discovery of respiratory chain complex I defects in the brain of sporadic PD patients in a post mortem assessment has indicated an important role of mitochondria in the pathogenesis of disease (Schapira et al., 1990; Parker et al., 2008). To our knowledge, there are no studies analyzing mitochondrial dysfunction with electronic microscopy in *D. melanogaster* with parkinsonism induced by PQ, which makes our study innovative. Up to now, only one study has shown mitochondrial dysfunction in *D. melanogaster* using biochemical methods. This work suggested that PQ, at acute exposure (24 hours) induces oxidative stress in adult flies (Hosamani and Muralidhara, 2013), which was not tested in our study. In mice heterozygous for Mn-SOD (Manganese superoxide dismutase), mitochondrial swelling is one of the first ultrastructural changes after PQ exposure, however, these findings were only reported under chronic exposure conditions. This may indicate that acute exposures are not sufficient to cause ultrastructural changes in mitochondria (Remmen et al., 2004).

Ultrastructural analyzes of 1 and 2-days-old *D. melanogaster* IFMs with mutant *parkin* revealed a severe disruption of muscle integrity, showing pronounced mitochondrial and muscular disintegration. These changes cause severe defects in

flight and climbing ability (Greene et al., 2003). In mutants *Drosophila PINK1*, IFMs ultrastructural analyses also demonstrated irregular arrangement of the densely swollen myofibers and mitochondria, with outer membrane loss, reducing muscle content and presenting mitochondrial impairment caused by apoptosis in these muscles. These mutant phenotypes were rescued with *PINK1* expression (Park et al., 2006). In our study, no changes were observed in *D. melanogaster* mitochondria and muscle fiber after acute PQ treatment, indicating that locomotor deficits in 15-days-old flies treated with PQ are not associated to ultrastructural changes in IFMs, and probably are associated to dopaminergic neuronal loss, which is in contrast with data about familial PD, where muscular dysfunction is also described. One interesting point to be evaluated in future studies could be the chronic effects of PQ treatment in *D. melanogaster* muscles.

In conclusion, our study is the first demonstrating the following findings: 1 - PQ treatment is more deleterious to survival and locomotion in mature *D. melanogaster* (15-days-old) when compared to very young *D. melanogaster* (2-days-old); 2 - These changes promoted by acute PQ treatment are not related to ultrastructural changes in IFMs, as observed in familial Parkinsonism in *D. melanogaster*.

## **MATERIAL AND METHODS**

### ***Drosophila* strain and culture maintenance**

For this study, we used 240 female, wild-type *Canton-S Drosophila melanogaster*. Flies were acquired from Bloomington *Drosophila* Stock Center, Indiana University, USA. They were maintained in incubator at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  under a 12 hours light/dark cycle, with 60 - 70% humidity, in housing pots containing standard medium prepared with 10g agar, 10g methylparaben (antifungal), 100g rye flour, 50g brown sugar, 1L water, and dried yeast. In control group, no PQ was added to the medium while for PQ medium, same ingredients were used and doses of 10, 50, 100, 150 and 200 mM PQ (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium ion, Syngenta) were added to medium.

## **Experimental groups**

Flies were divided into 12 groups, in accordance with age, 2 or 15-days-old, and PQ treatment doses, 0 (control), 10, 50, 100, 150 and 200 mM. Pupae hatching day was considered as flies first day of life. Number of flies used in each test is presented in Table 1. The first assessment performed was the survival curve, and then surviving animals were used for the locomotor test and transmission electron microscopy (TEM) analysis. Survival rate and locomotor behavior were evaluated 2 days after PQ treatment, consequently these parameters were evaluated in flies aging 4 and 17 day. Control and paraquat (PQ) 50 mM groups were chosen for TEM analysis, since PQ50 mM dose presents a significant difference between survival rates when comparing 2 and 15-days-old *D. melanogaster* (Table 1).

## **Locomotor evaluation**

Open field test was performed between 9 and 12 a.m. in a dark room with controlled temperature at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  and humidity at 60 - 70%. Illumination was provided by a negatoscope, to obtain a homogenous light source, in order to avoid negative or positive phototaxis.

A single fly was placed into an empty 60 mm Petri dish and the movement was recorded with a tripod-mounted digital video camera (Sony DCR-PJ5). The locomotor activity was evaluated for four minutes (the two first minutes were considered as exploratory locomotion and the next two minutes were considered as basal locomotion).

To quantify locomotor behavior the Anymaze® software was used ([www.anymaze.com](http://www.anymaze.com)) and parameters evaluated were distance travelled, average speed, mobile time and average speed in mobile time.

## **Transmission electron microscopy (TEM)**

The flies evaluated in locomotor assay were euthanized by hypothermia (20 minutes at  $-10^\circ\text{C}$ ) and were fixed in a 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde mixture buffered with 0.12 M phosphate (pH 7.2 - 7.4). Indirect flight muscles (IFMs) of

flies fixed were dissected, as described below. The wings, abdomen and legs were removed using very fine spring scissors (Vannas, 2mm, Fine Science Tools). A pin (Insect pin, 0.03 mm, Fine Science Tools) was placed between the head and the thorax to stabilize the fly. In order to expose IFMs, the thorax was cut in a sagittal plane using a scalpel blade (#23, 30 mm, Fine Science Tools).

The dissected thorax was once again fixed in the same fixative solution previously described, for at least one hour, post-fixed in osmium tetroxide (Electron Microscopy Science) 2% diluted in 0.2 M phosphate buffer (pH 7.2 - 7.4) for 45 min before dehydration. Samples were dehydrated in a graded acetone series (30 – 100%) and embedded in araldite (Durcupan ACM, Fluka) for 72 h at 60°C. Thin sections (100 nm) were stained with 2% uranyl acetate followed by lead citrate (Meira Martins *et al.*, 2014). Ultrastructural analysis was performed using Tecnai G2 T20, FEI transmission electron microscopy. The morphological evaluation of TEM images, by planar morphometry and stereology, were performed using Image Pro Plus software (IPP 6.1, Media Cybernetics, Silver Spring, USA) as described below.

### **Mitochondrial and muscular densities**

To estimate mitochondrial and muscular densities, we perform a quantitative analysis, by planar morphometry, similarly to the Neubauer chamber. Two randomized squares measuring 22.95  $\mu\text{m}^2$ , named areas of interest (AOIs), were overlaid on each TEM image (3600X), and mitochondria and muscle fiber located inside each square or intersected by the upper and/or left edges of the squares were counted.

### **Percentage of area covered by mitochondria and muscle fiber**

The percentage of area covered by mitochondria and muscle were estimated using an stereological tool, the point counting method (Ilha *et al.*, 2008; Rucatti *et al.*, 2015; Fernandes *et al.*, 2016). A grid mask 220 X 220 (a grid of crosses with equidistant intervals) with an area/point value of 1.96  $\mu\text{m}^2$ , was overlaid in TEM images. When the upper right quadrant of the cross hit mitochondria images or muscle fiber images they were counted.

### **Mitochondrial and muscle fiber area**

To estimate mitochondrial and muscle fiber area, we use the same TEM images and AOIs previously described in 2.4.1 section, a grid mask with more density of crosses was overlaid in these images 60 X 60 and an area/point value of 0.14  $\mu\text{m}^2$ . The number of right upper quadrant of crosses (number of crosses) located in each mitochondria or muscle fiber was counted. The area of each mitochondria or muscular fiber was obtained using the following equation: Mitochondrial or muscle fiber area = number of crosses counted in each mitochondria or muscle fiber X area point of each cross.

### **Mitochondrial and muscle fiber Shape Z**

The same TEM Images and AOIs previously analyzed were also used to calculate mitochondrial and muscle fiber coefficient shape (Shape Z). The shape Z, i.e. the shape coefficient (Kiêu et al., 1999; García-Fiñana et al., 2003) was used to obtain the degree of mitochondrial and muscle fiber elongation. This stereological parameter was obtained using the following equation:

$$Shape\ Z = \frac{P}{\sqrt{\hat{A}}}$$

Where P is mitochondrial or muscle fiber perimeter, and  $\hat{A}$  is mitochondrial or muscle fiber area. Mitochondrial and muscle fibers perimeters and areas were obtained by delineation using IPP 6.1 software. Low Shape Z values indicate a more rounded shape, while high values indicate a more elongated shape. In all analysis performed, 10 images were analyzed per group.

### **Statistical analysis**

Two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison post-test was used for comparisons between groups in all analyzed parameters ( $p < 0.05$ ). Statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics 25 (IBM, Armonk, NY, USA).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

PFRN, AW and LLX – study design; data interpretation and manuscript elaboration. PFRN, BBM, LVP, LTN, LCV, JHS, RBS, ELSS, MQV and PBB conducted experimental procedures. PFRN, LTN, RGM and LLX – data collection and interpretation.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed in part by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001; Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) – Grant Numbers 306644/ 2016-9 and 423884/2018-2; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). LLX is a CNPq researcher.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

## REFERENCES

- Bagatini, P. B. et al. (2011).** The role of calcium channel blockers and resveratrol in the prevention of paraquat-induced parkinsonism in *Drosophila melanogaster*: A locomotor analysis. *Invertebrate Neuroscience*, **11**, 43–51.
- Bardai, F. H. et al. (2018).** Lrrk promotes tau neurotoxicity through dysregulation of actin and mitochondrial dynamics. *PLoS Biology*, **16**, 1–28.
- Buford, T. W. et al. (2010).** Effects of Age and Sedentary Lifestyle on Skeletal Muscle NF- $\kappa$ B Signaling in Men. *Journal of Gerontology*, **65A**, 532–537.
- Buford, T. W. et al. (2013).** Models of Accelerated Sarcopenia: Critical Pieces for Solving the Puzzle of Age-Related Muscle Atrophy. *Ageing Research Reviews*, **9**, 369–383.
- Burke, R. E. (2011).** Motor units: anatomy, physiology, and functional organization. In *Handbook of Physiology*, pp. 345–422.
- Cassar, M. et al. (2015).** A dopamine receptor contributes to paraquat-induced neurotoxicity in *Drosophila*. *Human Molecular Genetics*, **24**, 197–212.
- Chaudhuri, A. et al. (2007).** Interaction of genetic and environmental factors in a



Drosophila parkinsonism model. *Journal of Neuroscience*, **27**, pp. 2457–2467.

**Clark, I. E. et al. (2006)**. Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature*, **441**, 1162–1166.

**Deng, H. et al. (2008)**. The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 14503–14508.

**Dickson, D. W. (2018)**. Neuropathology of Parkinson disease, *Parkinsonism and Related Disorders*, **46**, S30–S33.

**Faivre, F. et al. (2019)**. The hidden side of Parkinson's disease: Studying pain, anxiety and depression in animal models, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, **96**, 335–352.

**Falvo, M. J. et al. (2008)**. Parkinson's disease and resistive exercise: Rationale, review, and recommendations. *Movement Disorders*, **23**, pp. 1–11. doi: 10.1002/mds.21690.

**Fernandes, R. O. et al. (2016)**. Sulforaphane effects on postinfarction cardiac remodeling in rats: Modulation of redox-sensitive prosurvival and proapoptotic proteins. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **34**, 106–117.

**Ganguly-Fitzgerald, I. et al. (2006)**. Waking experience affects sleep need in Drosophila. *Science*, **313**, 1775–1781.

**García-Fiñana, M. et al. (2003)**. Comparison of MR imaging against physical sectioning to estimate the volume of human cerebral compartments. *NeuroImage*, **18**, 505–516.

**Greene, J. C. et al. (2003)**. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in Drosophila parkin mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**, 4078–4083.

**Guo, M. (2012)**. Drosophila as a model to study mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **2**, 1–17.

**Hao, L. Y., et al. (2010)**. DJ-1 is critical for mitochondrial function and rescues PINK1 loss of function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 9747–9752.

**Hosamani, R. and Muralidhara (2013)**. Acute exposure of Drosophila melanogaster to paraquat causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **83**, 25–40.

**Hwang, S. et al. (2013)**. Drosophila DJ-1 Decreases Neural Sensitivity to Stress by Negatively Regulating Daxx-Like Protein through dFOXO. *PLoS Genetics*, **9**, 1-17.

**Ilha, J. et al. (2008)**. Endurance and resistance exercise training programs elicit specific effects on sciatic nerve regeneration after experimental traumatic lesion in rats. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, **22**, 355–366.

**Inamdar, A. A., et al. (2012)**. The protective effect of minocycline in a paraquat-induced Parkinsons disease model in drosophila is modified in altered genetic backgrounds. *Parkinson's Disease*, **212**, 1-16.

- Ja, W. W. et al. (2007).** Prandiology of *Drosophila* and the CAFE assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104** 8253–8256.
- Kiêu, K. et al. (1999).** Precision of systematic sampling and transitive methods. *Journal of Statistical Planning and Inference*, **77**, 263-279.
- Klein, P. et al. (2014).** Ret rescues mitochondrial morphology and muscle degeneration of *Drosophila* Pink1 mutants, *EMBO Journal*, **33**, 341–355.
- Krüger, R. (2004).** Genes in familial parkinsonism and their role in sporadic Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Supplement*, **251**(6), pp. 2–6. doi: 10.1007/s00415-004-1602-x.
- Maitra, U. et al. (2019).** Innate immune responses to paraquat exposure in a *Drosophila* model of Parkinson's disease, *Scientific Reports*, **9**, 1–17.
- Malik, B. R., et al. (2015).** VPS35 pathogenic mutations confer no dominant toxicity but partial loss of function in *Drosophila* and genetically interact with parkin. *Human Molecular Genetics*, **24**, 6106–6117.
- Martin, L. J. (2006).** Parkinson's Disease -Synuclein Transgenic Mice Develop Neuronal Mitochondrial Degeneration and Cell Death. *Journal of Neuroscience*, **26**, 41–50.
- Mehdi, S. H. and Qamar, A. (2013).** Paraquat-induced ultrastructural changes and dna damage in the nervous system is mediated via oxidative-stress-induced cytotoxicity in *drosophila melanogaster*. *Toxicological Sciences*, **134**, 355–365.
- Meira-Martins, L. A. et al. (2014).** The Interplay Between Apoptosis, Mitophagy and Mitochondrial Biogenesis Induced by Resveratrol Can Determine Activated Hepatic Stellate Cells Death or Survival. *Cell Biochemistry and Biophysics*, **71**, 657–672.
- Park, J. et al. (2006).** Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature*, **441**, 1157–1161.
- Park, J., et al. (2009).** Mitochondrial dysfunction and Parkinson's disease genes: Insights from *Drosophila*. *DMM Disease Models and Mechanisms*, **2**, 336–340.
- Parker, W. D., et al. (2008).** Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. *Brain Research*, **1189**, 215–218.
- Pesah, Y. (2004).** *Drosophila* parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress', *Development*, **131**, 2183–2194.
- Petit, A. et al. (2005).** Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 34025–34032.
- Remmen, H. et al. (2004).** Multiple deficiencies in antioxidant enzymes in mice result in a compound increase in sensitivity to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, **36**, 1625–1634.
- Romanello, V. and Sandri, M. (2016).** Mitochondrial quality control and muscle mass maintenance. *Frontiers in Physiology*, **6**, 1–21.
- Rucatti, A. et al. (2015).** Skeletal muscle electrical stimulation improves baroreflex sensitivity and heart rate variability in heart failure rats. *Autonomic Neuroscience: Basic*

and *Clinical*, **193**, 92–96.

**Schapira, A. H. V. et al. (1990).** Mitochondrial Complex I Deficiency in Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry*, **54**, 823–827.

**Shukla, A. K. et al. (2014).** A mutation in *Drosophila* methuselah resists paraquat induced Parkinson-like phenotypes. *Neurobiology of Aging*, **35**, 2419-2416.

**Si, H. et al. (2019).** Overexpression of pink1 or parkin in indirect flight muscles promotes mitochondrial proteostasis and extends lifespan in *Drosophila melanogaster*, *PLoS ONE*, **14**, 1–11.

**Song, D. D. et al. (2004).** Enhanced substantia nigra mitochondrial pathology in human  $\alpha$ -synuclein transgenic mice after treatment with MPTP. *Experimental Neurology*, **186**, 158–172.

**Svetec, N. and Ferveur, J. F. (2005).** Social experience and pheromonal perception can change male-male interactions in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, **208**, 891–898.

**Swank, D. M. (2012).** Mechanical analysis of *Drosophila* indirect flight and jump muscles. *Methods*, **56**, 69–77.

**Teismann, P. et al. (2003).** Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 5473–5478.

**Verma, A. and Ravindranath, V. (2020).** Ca V 1 . 3 L-Type Calcium Channels Increase the Vulnerability of Substantia Nigra Dopaminergic Neurons in MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease, *Frontiers in Aging Neuroscience*, **11**, 1–10.

**Vila, M. et al. (2008).** Mitochondrial alterations in Parkinson's disease: New clues. *Journal of Neurochemistry*, **107**, 317–328.

**Yang, Y. et al. (2006).** Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by Parkin, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 10793–10798.

**Ziviani, E. et al. (2010).** *Drosophila* Parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates Mitofusin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 5018–5023.

**Table 1** - Experimental groups and number of flies used in each analysis for each age group.

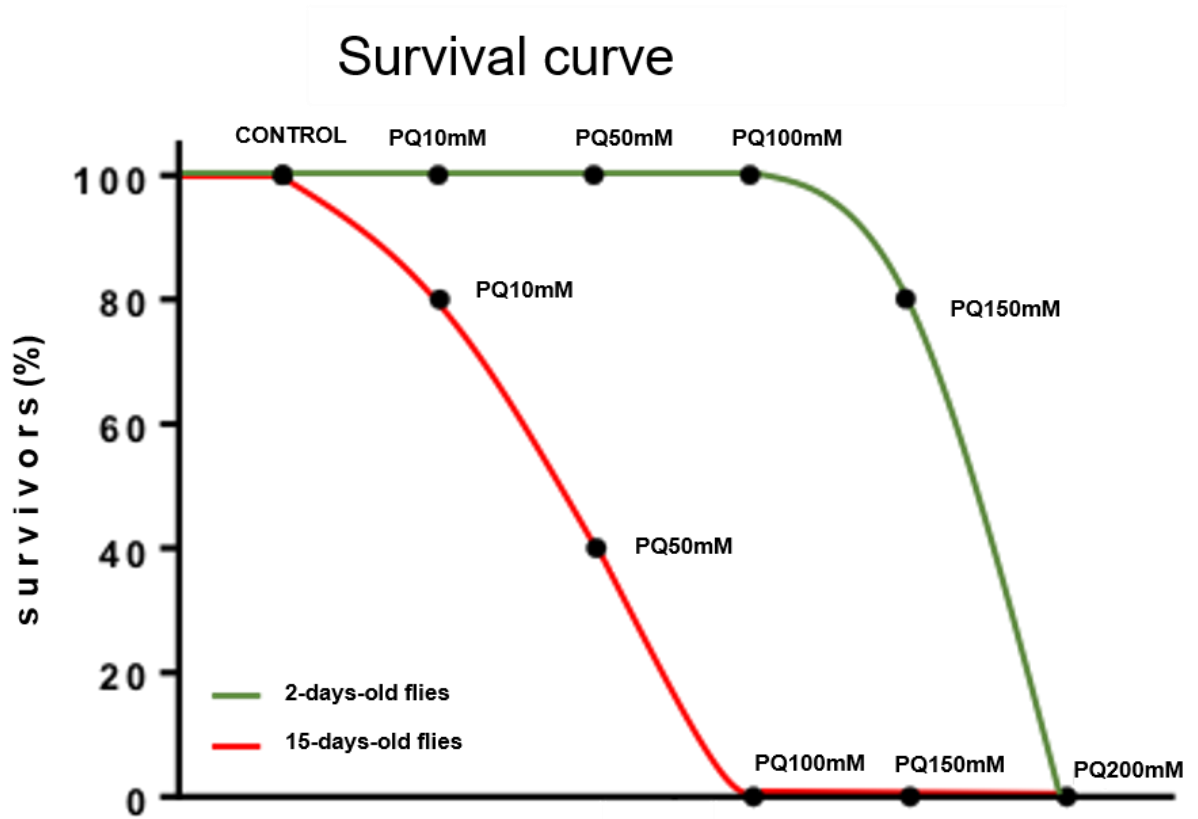
<b>Experimental Groups</b>	<b>2-days-old <i>D. melanogaster</i></b>		
	<i>Evaluated Parameters</i>		
	<b>Survival (n=120)</b>	<b>Locomotion (n=96)</b>	<b>TEM (n=10)</b>
Control Group	(n=20)	(n=20)	(n=5)
PQ10mM	(n=20)	(n=20)	-
PQ50mM	(n=20)	(n=20)	(n=5)
PQ100mM	(n=20)	(n=20)	-
PQ150mM	(n=20)	(n=16)	-
PQ200mM	(n=20)	†	-

<b>Experimental Groups</b>	<b>15-days-old <i>D. melanogaster</i></b>		
	<i>Evaluated Parameters</i>		
	<b>Survival (n=120)</b>	<b>Locomotion (n=44)</b>	<b>TEM (n=10)</b>
Control Group	(n=20)	(n=20)	(n=5)
PQ10mM	(n=20)	(n=16)	-
PQ50mM	(n=20)	(n=8)	(n=5)
PQ100mM	(n=20)	†	-
PQ150mM	(n=20)	†	-
PQ200mM	(n=20)	†	-

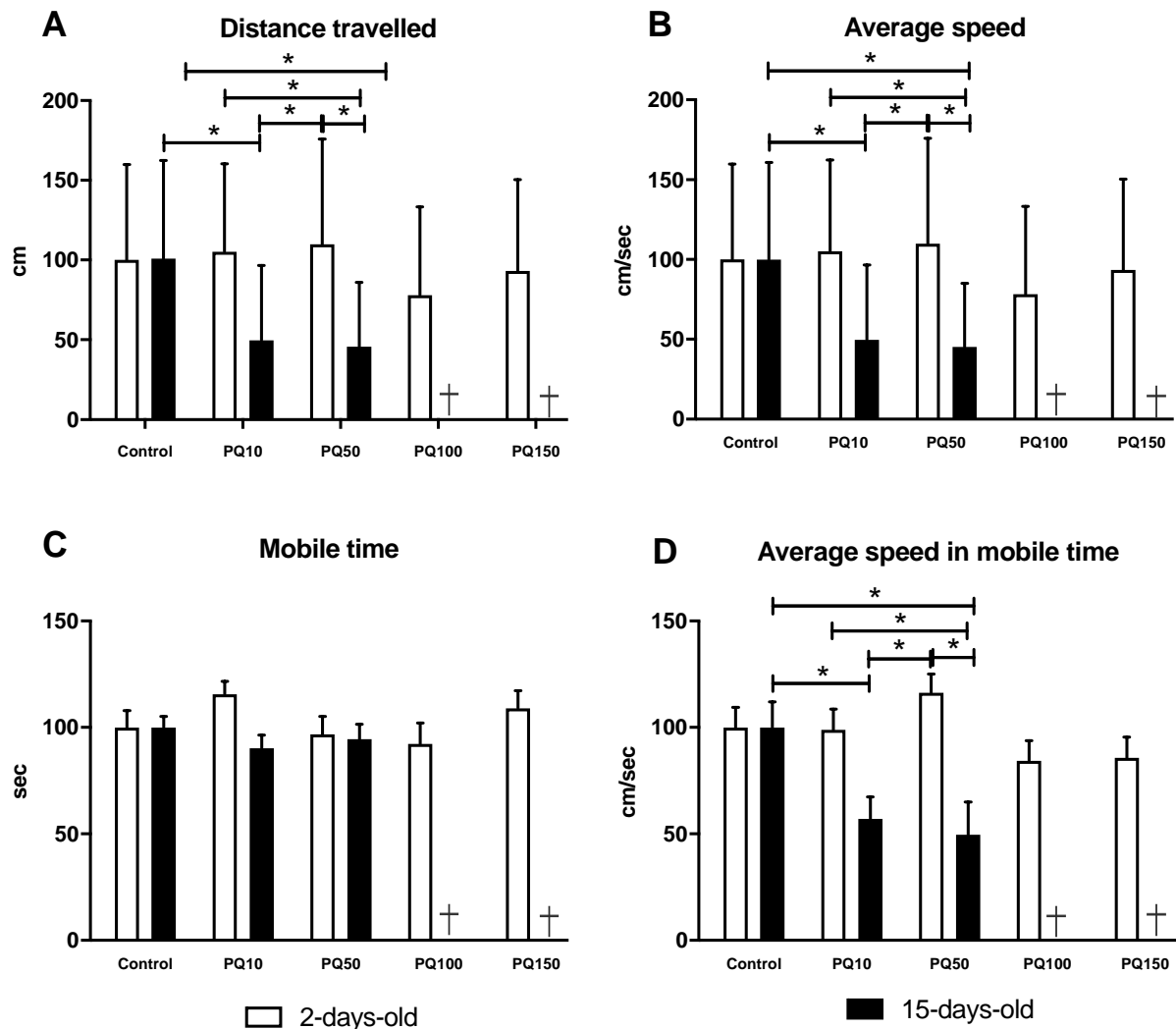
Legends: † = 100% of lethality.

**Figure 1** - Survival Curve of 2 and 15-days-old *D. melanogaster* exposed to different paraquat (PQ) doses: 0 (control) 10, 50, 100, 150 and 200 mM, for 48 hours.



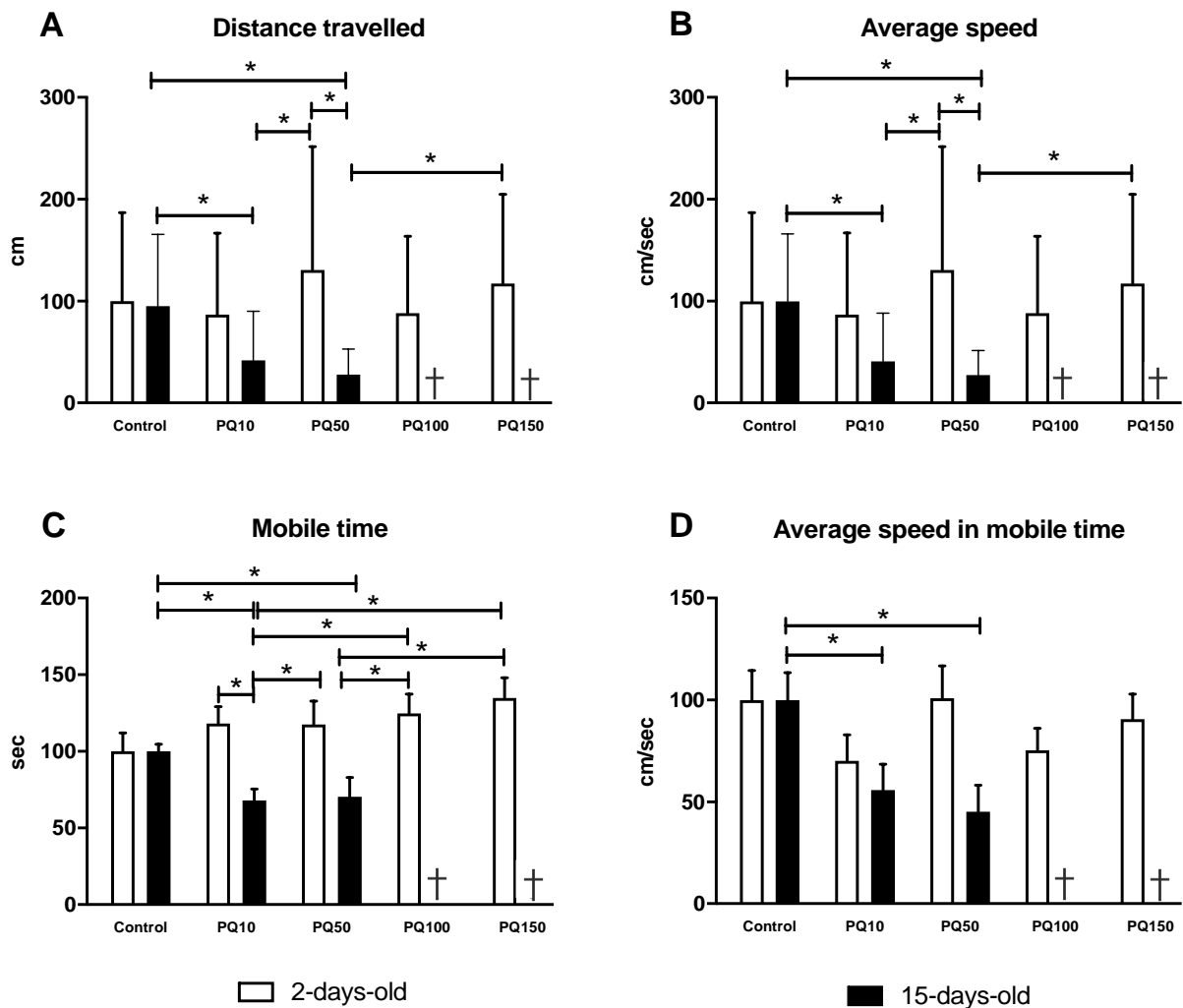
**Figure 2** - Exploratory locomotion evaluation in 2 and 15-days-old *D. melanogaster*. In the graph are depicted data from control and surviving flies from both 2 and 15-days-old flies exposed to different paraquat (PQ) doses: 10, 50, 100, 150 and 200 mM, for 48 hours. In between groups statistical analysis demonstrated no significant differences when analyzing 2-days-old *D. melanogaster*, in all treatments used. Regarding 15-days-old *D. melanogaster* treated with PQ, in between groups analysis indicate a significant decrease in distance travelled, average speed and average speed in mobile time as higher the PQ dose exposition (2A; 2B and 2D). Which was also true when comparing exploratory locomotion between different PQ doses taking into account ages: 15-days-old flies also present significant reduced distance travelled, average speed and average speed in mobile time as higher the PQ dose exposition (2A; 2B and 2D). Two-way ANOVA-Tukey test. Data is presented as mean  $\pm$  s.e.m. \*  $p < 0,05$ .

### Exploratory Locomotion

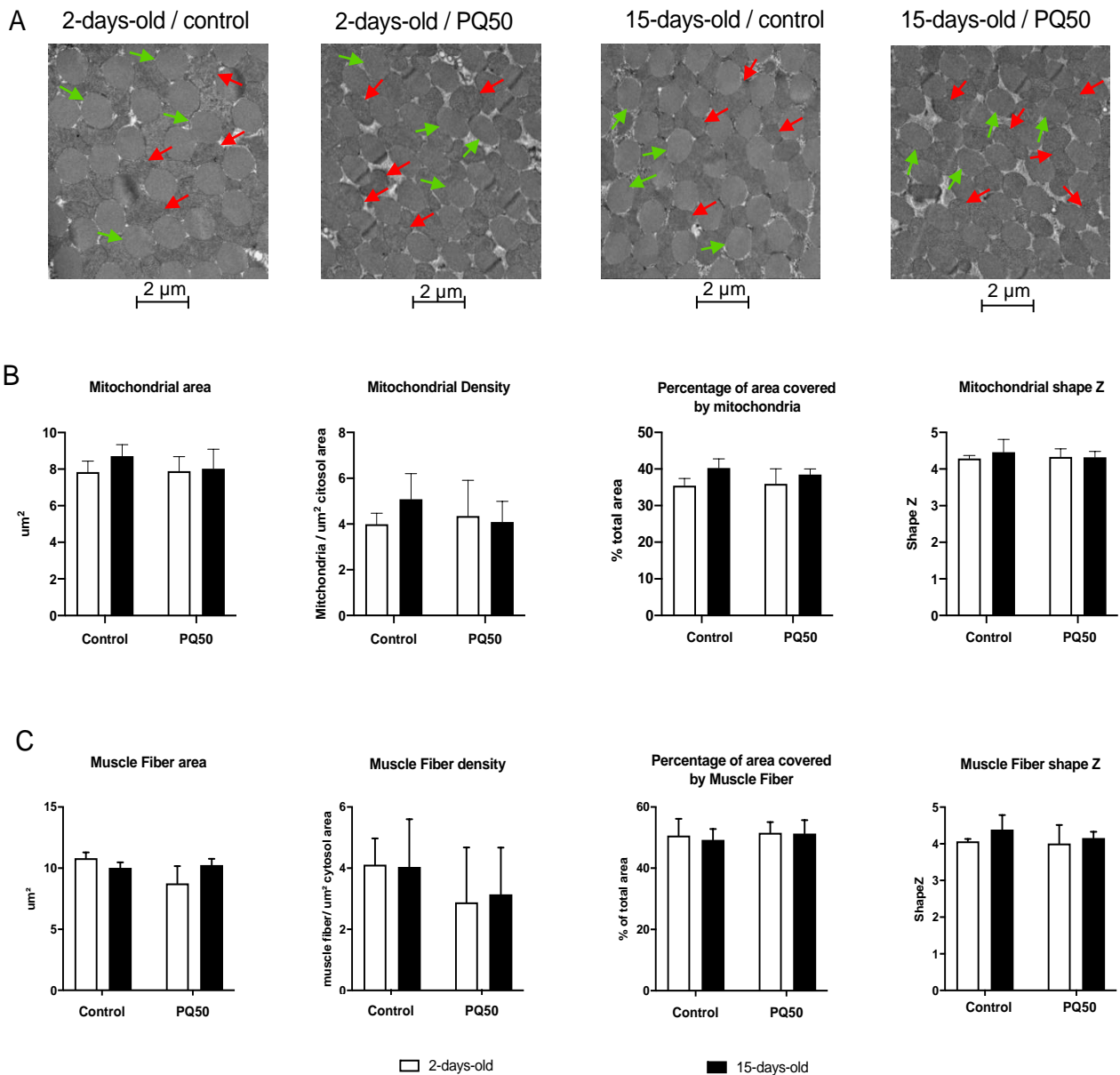


**Figure 3** - Basal locomotor evaluation in 2 and 15-days-old *D. melanogaster*. In the graph are depicted data from control and surviving flies exposed to different concentrations of paraquat (PQ): 10, 50, 100, 150 and 200 mM, for 48 hours. In between groups statistical analysis demonstrated no significant differences when analyzing 2-days-old *D. melanogaster*, in all treatments used. Regarding 15-days-old *D. melanogaster* treated with PQ, analysis comparing different doses indicate a significant decrease in distance travelled, average speed and average speed in mobile time as higher the PQ dose exposition (3A; 3B and 3D). Considering mobile time, it was also significantly reduced when compared to control, however, PQ dose apparently not influenced this parameter (3C). The same was observed when comparing basal locomotion between different PQ doses taking into account ages: 15-days-old flies also present significant reduced distance travelled, average speed and mobile time (3A; 3B and 3C). No significant differences were observed when comparing different PQ doses between 2 and 15-days-old flies (3D). Two-way ANOVA-Tukey test. Data is presented as mean  $\pm$  s.e.m. \*  $p < 0,05$ .

### Basal Locomotion



**Figure 4** - Morphological, morphometric and stereological evaluation of transmission electron microscopy (TEM) images obtained from Indirect Flight Muscles (IFMs) of both control *D. melanogaster* and treated with paraquat (PQ) 50 mM dose in different ages, 2 and 15 days old. No qualitative or quantitative differences were found in all analyzed parameters from mitochondria and muscle fibers: density, percentage of area covered, area and shape Z. A= TEM images depicting mitochondria and muscle fibers; green arrows indicates muscle fibers, while red arrows points to mitochondria; B= Mitochondrial parameters; C= Muscular parameters. Two-way ANOVA - Tukey test. Data is presented as mean  $\pm$  s.e.m. Calibration bar= 2  $\mu$ m.





## **CAPÍTULO III**

Considerações Finais

Perspectivas

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os principais resultados obtidos com essa dissertação de mestrado, apresentados e discutidos no artigo submetido utilizando *D. melanogaster* da linhagem *Canton-S*, com 2 e 15 dias de vida pós eclosão, jovens e maduras, respectivamente, tratadas com diferentes doses de Paraquat (PQ) (0, 10, 50, 150 e 200mM) diluídas no meio alimentar, foram:

- 1- As moscas jovens apresentam maior resistência quando comparadas a moscas maduras, em relação à sobrevivência, ao tratamento com diferentes doses de PQ. Isso indica que os mecanismos tóxicos induzidos pelo PQ são mais efetivos em animais maduros e/ou os mecanismos protetores são mais acentuados em animais jovens. Distintos mecanismos de resistência ao PQ em *D. melanogaster* foram previamente descritos na literatura, incluindo mutação presente em *Drosophila methuselah (mth<sup>1</sup>)*, a utilização de medicamentos como a minociclina, e mecanismos protetores inerentes à outras linhagens, como *Oregon*, capaz de resistir ao tratamento com até 500mM de PQ. Nenhum mecanismo de resistência ao PQ, relacionado a idade dos animais, foi previamente descrito; contudo, duas hipóteses principais podem ser levantadas sobre tal resultado, como: a) Uma diferença de ingesta entre esses dois grupos etários, com maior ingesta alimentar pelo grupo de moscas maduras; b) Uma diferença na metabolização ou transporte intracelular do PQ entre os grupos, conduzindo a uma maior toxicidade no grupo de moscas com 15 dias de idade.
- 2- As moscas maduras são mais suscetíveis aos déficits locomotores promovidos pelo PQ quando comparados a moscas jovens, uma vez que, quando comparados aos grupos controle, os animais maduros apresentam uma redução de parâmetros de comportamento locomotor (distância percorrida, velocidade média, tempo móvel e velocidade média no tempo móvel), o que caracteriza um padrão bradicinético, similar a sintomas parkinsonianos. Esses resultados indicam que o PQ tem efeitos locomotores idade-dependentes. Em relação a esse resultado, em consonância com as hipóteses descritas no item anterior, podemos também sugerir que os animais maduros são mais suscetíveis à perda neuronal dopaminérgica, característica da intoxicação por

PQ, por maior ingestão e/ou maior absorção e/ou diferenças metabólicas que potencializem os efeitos desse herbicida.

- 3- Nas análises das imagens de MET dos MIVs de *D. melanogaster* analisados, utilizando-se técnicas de morfometria planar e estereologia, não foram observadas alterações significativas nas idades e dose de PQ testada (50mM), nos seguintes parâmetros ultraestruturais das fibras musculares e mitocôndrias: densidade, porcentagem de área coberta, área e coeficiente de forma "ShapeZ". Este resultado diverge do encontrado em estudos prévios realizados com mutantes de *D. melanogaster* para mimetização de DP familiar; os mutantes nesses estudos apresentam severa desintegração muscular e mitocondrial, mitocôndrias inchadas e deformadas, além de uma diminuição de fibras musculares, o que produz efeitos funcionais significativos nesses animais, como dificuldades no voo e na escalada. Dos nossos achados, podem surgir algumas ideias, descritas a seguir: a) As alterações ultraestruturais promovidas pelo Parkinson familiar nos MIVs são muito mais efetivas do que as produzidas pelo tratamento agudo com PQ; b) Os efeitos ultraestruturais deletérios do PQ inexistem nos MIVs na dose testada, sendo talvez restritos a outros tecidos, como o nervoso; c) Os efeitos nocivos do PQ sobre a ultraestrutura das fibras musculares e das mitocôndrias se apresentem apenas em tratamentos crônicos e não na dose aguda utilizada.
- 4- Esperamos que os resultados obtidos e apresentados nesta dissertação possam contribuir para um melhor entendimento sobre os mecanismos de resistência de *D. melanogaster* ao PQ em diferentes idades, ampliando o conhecimento sobre a "quimera" da DP. A seguir, apresentaremos as perspectivas de trabalho originadas pelo nosso estudo.

## 5 PERSPECTIVAS

Após a conclusão desse estudo, surgem distintas perspectivas. Cito abaixo as principais e mais plausíveis dentro do contexto institucional vigente.

- 1) Monitoramento da ingestão de alimentos e conseqüentemente de PQ, através do uso de marcadores ou corantes adicionados ao meio alimentar, de modo a confirmar a maior ou menor ingesta de PQ em diferentes grupos experimentais;
- 2) Avaliação de parâmetros similares aos empregados nessa dissertação, com uso de *D. melanogaster* de diferentes linhagens (*Oregon*), gêneros e diferentes idades.
- 3) Análises moleculares no sistema nervoso e musculatura de *D. melanogaster* de diferentes linhagens e idades, avaliando níveis de receptores de dopamina e transportadores de agentes indutores de parkinsonismo.
- 4) Avaliação dos *clusters* dopaminérgicos no cérebro de *D. melanogaster* com a técnica imunohistoquímica para detecção de tirosina-hidroxilase (TH) e técnica de Nissl, com estimativa de a densidade neuronal e de neurônios positivos para TH, através de morfometria planar e/ou estereologia, a fim de confirmar se os déficits locomotores estão associados à perda dopaminérgica.
- 5) Avaliação dos efeitos do tratamento crônico com PQ, sobre parâmetros de sobrevivência, locomoção e ultraestrutura muscular e neuronal.
- 6) Avaliação anatômica de *D. melanogaster*, com uso de microscopia eletrônica de varredura, em moscas submetidas ao tratamento agudo e crônico com PQ.

## REFERÊNCIAS

1. Santangelo G, Piscopo F, Barone P, Vitale C. Personality in Parkinson's disease: Clinical, behavioural and cognitive correlates. **J Neurol Sci** [Internet]. 2017;374:17–25.
2. Hindle J V. Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. **Age Ageing**. 2010;39(2):156–61.
3. Faivre F, Joshi A, Bezard E, Barrot M. The hidden side of Parkinson's disease: Studying pain, anxiety and depression in animal models. **Neurosci Biobehav Rev** [Internet]. 2019;96(September 2018):335–52.
4. Lees AJ. The Parkinson chimera. **Neurology** [Internet]. 2009 Feb 17;72(7 Supplement 2):S2 LP-S11.
5. Tran HH, Dang SNA, Nguyen TT, Huynh AM, Dao LM, Kamei K, et al. Drosophila Ubiquitin C-Terminal Hydrolase Knockdown Model of Parkinson's Disease. **Sci Rep** [Internet]. 2018;8(1):1–14.
6. Yokoyama H, Kuroiwa H, Yano R, Araki T. Targeting reactive oxygen species, reactive nitrogen species and inflammation in MPTP neurotoxicity and Parkinson's disease. **Neurol Sci**. 2008;29(5):293–301.
7. Tysnes OB, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease. **J Neural Transm**. 2017;124(8):901–5.
8. Mandel JS, Adami HO, Cole P. Paraquat and Parkinson's disease: An overview of the epidemiology and a review of two recent studies. **Regul Toxicol Pharmacol** [Internet]. 2012;62(2):385–92.
9. Jost WH, Reichmann H. "An essay on the shaking palsy" 200 years old. **J Neural Transm**. 2017;124(8):899–900.
10. Ruberg M, Scherman D, Jauoy-Agid F, Agid Y. Dopamine denervation, age of onset, and Parkinson's disease. **Neurology**. 1995;45(2):392.
11. Lamotte G, Morello R, Lebasnier A, Agostini D, Bouvard G, De La Sayette V, et al. Influence of education on cognitive performance and dopamine transporter binding in dementia with Lewy bodies. **Clin Neurol Neurosurg** [Internet]. 2016;146:138–43.
12. Verma A, Ravindranath V. Ca V 1 . 3 L-Type Calcium Channels Increase the Vulnerability of Substantia Nigra Dopaminergic Neurons in MPTP Mouse Model of Parkinson ' s Disease. **Front Aging Neurosci**. 2020;11(January):1–10.
13. Eriksen JL, Petrucelli L. Parkinson's disease - Molecular mechanisms of disease. **Drug Discov Today Dis Mech**. 2004;1(4):399–405.
14. Allain H, Bentué-Ferrer D, Akwa Y. Disease-modifying drugs and Parkinson's disease. **Prog Neurobiol**. 2008;84(1):25–39.
15. Maguire-Zeiss KA. alpha-Synuclein: a therapeutic target for Parkinson's disease? **Pharmacol Res** [Internet]. 2008;58(5–6):271–80.

16. Ataya TAW, Himohama SHUNS, Hiba SHC. Oxidative Damage Is the Earliest Event in Alzheimer Disease. **J Neuropathol Exp Neurol**. 2001;60(8):759–67.
17. Schapira AH V., Bezard E, Brotchie J, Calon F, Collingridge GL, Ferger B, et al. Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. **Nat Rev Drug Discov** [Internet]. 2006;5(10):845–54.
18. Ropper, AH; Samuels, MA; Klein, JP. **Adams and Victor's – Principles of Neurology**. 10th. New York: McGraw-Hill Medical Pub, 1664p. 2014.
19. Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Goetz CG, Marin C, Kordower JH, Rodriguez M, et al. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. **Nat Med** [Internet]. 2010;16(6):653–61.
20. Watson GS, Leverenz JBB. Profile of Cognitive Impairment in Parkinson's Disease. **Brain Pathol** [Internet]. 2010;20(3):640–645.
21. Belgacem YH, Martin J-R. Neuroendocrine control of a sexually dimorphic behavior by a few neurons of the pars intercerebralis in *Drosophila*. **Proc Natl Acad Sci** [Internet]. 2002;99(23):15154–8.
22. Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM. The substantia nigra of the human brain: II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. **Brain**. 1999;122(8):1437–48.
23. Brann DW, Dhandapani K, Wakade C, Mahesh VB, Khan MM. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: Basic mechanisms and clinical implications. **Steroids**. 2007;72(5):381–405.
24. Gillies GE, Pienaar IS, Vohra S, Qamhawi Z. Sex differences in Parkinson's disease. **Front Neuroendocrinol** [Internet]. 2014;35(3):370–84.
25. Gillies GE, Murray HE, Dexter D, McArthur S. Sex dimorphisms in the neuroprotective effects of estrogen in an animal model of Parkinson's disease. **Pharmacol Biochem Behav**. 2004;78(3):513–22.
26. De Miranda BR, Fazzari M, Rocha EM, Castro S, Greenamyre JT. Sex Differences in Rotenone Sensitivity Reflect the Male-to-Female Ratio in Human Parkinson's Disease Incidence. **Toxicol Sci**. 2019;170(1):133–43.
27. Klein C, Schlossmacher MG. Parkinson disease, 10 years after its genetic revolution: Multiple clues to a complex disorder. **Neurology** [Internet]. 2007 Nov 27;69(22):2093 LP – 2104.
28. Vila M, Ramonet D, Perier C. Mitochondrial alterations in Parkinson's disease: New clues. **J Neurochem**. 2008;107(2):317–28.
29. Pickrell AM, Youle RJ. The Roles of PINK1, Parkin and Mitochondrial Fidelity in Parkinson's Disease. **Neuron**. 2016;85(2):257–73.
30. Ge X, Hua H, Zhang A. Inhibition of mitochondrial complex I by rotenone protects against acetaminophen-induced liver injury. **American Journal of Translational Research**. 2019;11(1):188-198.
31. Costa B, Dumon E, Moigno LL, Bodard S, Castelnau P, Letellier T et al. Respiratory chain inhibition: one more feature to propose MPTP intoxication as a Leigh syndrome model. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**.

- 2016;48:483-491.
32. Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, et al. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. **J Neurosci** [Internet]. 2003;23(34):10756–64.
  33. Canet-Aviles RM, Wilson MA, Miller DW, Ahmad R, McLendon C, Bandyopadhyay S, et al. The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. **Proc Natl Acad Sci** [Internet]. 2004;101(24):9103–8.
  34. Silvestri L, Caputo V, Bellacchio E, Atorino L, Dallapiccola B, Valente EM, et al. Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. **Hum Mol Genet**. 2005;14(22):3477–92.
  35. Squillaro T, Cambi F, Ciacci G, Rossi S, Ulivelli M, Malandrini A, et al. Frequency of the LRRK2 G2019S mutation in Italian patients affected by Parkinson's disease. **J Hum Genet**. 2007;52(3):201–4.
  36. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, et al. Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. **Science**. 1997;276(5321):2045–7.
  37. Liu Y, Ma X, Fujioka H, Liu J, Chen S, Zhu X. DJ-1 regulates the integrity and function of ER-mitochondria association through interaction with IP3R3-Grp75-VDAC1. **Proc Natl Acad Sci** [Internet]. 2019;116(50):25322–8.
  38. Ramezani, M., Wilkes, M., Das, T., Holowka, D., Eliezer, D., & Baird, B. (2019). Alpha-Synuclein Modulates Stimulated Exocytosis and Binds to Mitochondria. **Biophysical Journal**, 116(3), 494a.
  39. Simon DK, Pulst SM, Sutton JP, Browne SE, Beal MF, Johns DR. Familial multisystem degeneration with parkinsonism associated with the 11778 mitochondrial DNA mutation. **Neurology** [Internet]. 1999;53(8):1787–93.
  40. Song DD, Shults CW, Sisk A, Rockenstein E, Masliah E. Enhanced substantia nigra mitochondrial pathology in human  $\alpha$ -synuclein transgenic mice after treatment with MPTP. **Exp Neurol**. 2004;186(2):158–72.
  41. Martin LJ. Parkinson's Disease -Synuclein Transgenic Mice Develop Neuronal Mitochondrial Degeneration and Cell Death. **J Neurosci** [Internet]. 2006;26(1):41–50.
  42. Darios F, Corti O, Lücking CB, Hampe C, Muriel MP, Abbas N, et al. Parkin prevents mitochondrial swelling and cytochrome c release in mitochondria-dependent cell death. **Hum Mol Genet**. 2003;12(5):517–26.
  43. Kuroda Y, Mitsui T, Kunishige M, Shono M, Akaike M, Azuma H, et al. Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. **Hum Mol Genet**. 2006;15(6):883–95.
  44. Chung KKK, Thomas B, Li X, Pletnikova O, Troncoso JC, Marsh L, et al. S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. **Science**. 2004;304(5675):1328–31.
  45. Bonifati V, Rizzu P, Van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, et al.

- Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. **Science**. 2003;299(5604):256–9.
46. Meulener MC, Graves CL, Sampathu DM, Armstrong-Gold CE, Bonini NM, Giasson BI. DJ-1 is present in a large molecular complex in human brain tissue and interacts with  $\alpha$ -synuclein. **J Neurochem**. 2005;93(6):1524–32.
  47. Tang B, Xiong H, Sun P, Zhang Y, Wang D, Hu Z, et al. Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-onset Parkinson's disease. **Hum Mol Genet**. 2006;15(11):1816–25.
  48. Kim RH, Smith PD, Aleyasin H, Hayley S, Mount MP, Pownall S, et al. Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. **Proc Natl Acad Sci** [Internet]. 2005;102(14):5215–20.
  49. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MMK, Harvey K, Gispert S, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. **Science**. 2004;304(5674):1158–60.
  50. Petit A, Kawarai T, Paitel E, Sanjo N, Maj M, Scheid M, et al. Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. **J Biol Chem**. 2005;280(40):34025–32.
  51. Buford TW, Cooke MB, Manini TM, Leeuwenburgh C, Willoughby DS. Effects of Age and Sedentary Lifestyle on Skeletal Muscle NF- $\kappa$ B Signaling in Men. **J Gerontol**. 2010;65A(5):532–7.
  52. Burke RE. Motor units: anatomy, physiology, and functional organization. In: **Handbook of Physiology**. 2011. p. 345–422.
  53. Buford TW, Anton SD, Judge AR, Marzetti E, Stephanie E, Carter CS, et al. Models of Accelerated Sarcopenia: Critical Pieces for Solving the Puzzle of Age-Related Muscle Atrophy. **Ageing Res Rev**. 2013;9(4):369–83.
  54. Falvo MJ, Schilling BK, Earhart GM. Parkinson's disease and resistive exercise: Rationale, review, and recommendations. **Mov Disord**. 2008;23(1):1–11.
  55. Romanello V, Sandri M. Mitochondrial quality control and muscle mass maintenance. **Front Physiol**. 2016;6(JAN):1–21.
  56. Hood DA, Memme JM, Oliveira AN, Triolo M. Maintenance of Skeletal Muscle Mitochondria in Health, Exercise, and Aging. **Annu Rev Physiol**. 2019;81(1):19–41.
  57. Dermietzel R, Spray DC. Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why? **Trends Neurosci**. 1993;16(5):186–92.
  58. Harris AL. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. **Prog Biophys Mol Biol**. 2007;94(1–2):120–43.
  59. Cao Z. Mitochondrial DNA deletion mutations are concomitant with ragged red regions of individual, aged muscle fibers: analysis by laser-capture microdissection. **Nucleic Acids Res** [Internet]. 2001;29(21):4502–8.



60. Lee CM, Lopez ME, Weindruch R, Aiken JM. Association of age-related mitochondrial abnormalities with skeletal muscle fiber atrophy. **Free Radic Biol Med.** 1998;25(8):964–72.
61. Powers SK, Wiggs MP, Duarte JA, Zergeroglu AM, Demirel HA. Mitochondrial signaling contributes to disuse muscle atrophy. **AJP Endocrinol Metab** [Internet]. 2012;303(1):E31–9.
62. Peker N, Donipadi V, Sharma M, McFarlane C, Kambadur R. Loss of Parkin impairs mitochondrial function and leads to muscle atrophy. **Am J Physiol Cell Physiol.** 2018;(59):In press.
63. Dinis-Oliveira RJ, Remião F, Carmo H, Duarte JA, Navarro AS, Bastos ML, et al. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. **Neurotoxicology.** 2006;27(6):1110–22.
64. Costello S, Cockburn M, Bronstein J, Zhang X, Ritz B. Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. **Am J Epidemiol.** 2009;169(8):919–26.
65. Tanner CM, Kame F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. **Environ Health Perspect.** 2011;119(6):866–72.
66. Jadavji NM, Murray LK, Emmerson JT, Rudyk CA, Hayley S, Smith PD. Paraquat exposure increases oxidative stress within the dorsal striatum of male mice with a genetic deficiency in one-carbon metabolism. **Toxicol Sci.** 2019;169(1):25–33.
67. Vaccari C, El Dib R, de Camargo JL V. Paraquat and Parkinson's disease: A systematic review protocol according to the OHAT approach for hazard identification. **Syst Rev.** 2017;6(1):1–8.
68. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Anvisa autoriza o uso do paraquat por mais três anos. 2017. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/anvisa-autoriza-uso-do-paraquat-por-mais-tres-anos>. Acesso em: 29 jan. 2020.
69. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: Mechanisms and models. **Neuron.** 2003;39(6):889–909.
70. Shimizu K, Ohtaki K, Matsubara K, Aoyama K, Uezono T, Saito O, et al. Carrier-mediated processes in blood-brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. **Brain Res.** 2001;906(1–2):135–42.
71. Yang W, Chen L, Ding Y, Zhuang X, Kang UJ. Paraquat induces dopaminergic dysfunction and proteasome impairment in DJ-1-deficient mice. **Hum Mol Genet.** 2007;16(23):2900–10.
72. Yang W, Tiffany-Castiglioni E, Koh HC, Son IH. Paraquat activates the IRE1/ASK1/JNK cascade associated with apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Toxicol Lett.** 2009;191(2–3):203–10.
73. Chorfa A, Bétemps D, Morignat E, Lazizzera C, Hogeveen K, Andrieu T, et al. Specific pesticide-dependent increases in  $\alpha$ -synuclein levels in human neuroblastoma (SH-SY5Y) and melanoma (SK-MEL-2) cell lines. **Toxicol Sci.**

- 2013;133(2):289–97.
74. Blanco Ayala T, Andérica-Romero A, Pedraza-Chaverri J. New insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity. **Free Radic Res.** 2014 Mar 5;48.
  75. Pardridge WM. Drug transport across the blood-brain barrier. **J Cereb Blood Flow Metab.** 2012;32(11):1959–72.
  76. Kuter K, Śmiałowska M, Wierońska J, Zieba B, Wardas J, Pietraszek M, et al. Toxic influence of subchronic paraquat administration on dopaminergic neurons in rats. **Brain Res.** 2007;1155(1):196–207.
  77. Kuter K, Nowak P, Gołombiowska K, Ossowska K. Increased reactive oxygen species production in the brain after repeated low-dose pesticide paraquat exposure in rats. A comparison with peripheral tissues. **Neurochem Res.** 2010;35(8):1121–30.
  78. Castello PR, Drechsel DA, Patel M. Mitochondria are a major source of paraquat-induced reactive oxygen species production in the brain. **J Biol Chem.** 2007;282(19):14186–93.
  79. Richardson JR, Quan Y, Sherer TB, Greenamyre JT, Miller GW. Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone. **Toxicol Sci.** 2005;88(1):193–201.
  80. McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, et al. Environmental risk factors and Parkinson's disease: Selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. **Neurobiol Dis.** 2002;10(2):119–27.
  81. Terron A, Bal-Price A, Paini A, Monnet-Tschudi F, Bennekou SH, Angeli K, et al. An adverse outcome pathway for parkinsonian motor deficits associated with mitochondrial complex I inhibition [Internet]. Vol. 92, **Archives of Toxicology.** Springer Berlin Heidelberg; 2018. 41–82 p.
  82. Friedrich T, Ohnishi T, Forche E, Kunze B, Jansen R, Trowitzsch W, et al. Two binding sites for naturally occurring inhibitors in mitochondrial and bacterial NADH: ubiquinone oxidoreductase (Complex I). **Biochem Soc Trans** [Internet]. 1994;22(1):226–30.
  83. Wirth C, Brandt U, Hunte C, Zickermann V. Structure and function of mitochondrial complex i. **Biochim Biophys Acta - Bioenerg** [Internet]. 2016;1857(7):902–14.
  84. Brandt U. Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. **Biochim Biophys Acta - Bioenerg.** 1997;1318(1–2):79–91.
  85. Mailloux RJ. Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species. **Redox Biol** [Internet]. 2015;4:381–98.
  86. Sheehan JP, Swerdlow RH, Parker WD, Miller SW, Davis RE, Tuttle JB. Altered calcium homeostasis in cells transformed by mitochondria from individuals with Parkinson's disease. **J Neurochem** [Internet].

- 1997;68(3):1221–33.
87. Willems PHGM, Valsecchi F, Distelmaier F, Verkaart S, Visch HJ, Smeitink JAM, et al. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup>homeostasis in human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency. **Cell Calcium**. 2008;44(1):123–33.
  88. Koopman WJH, Verkaart S, Visch HJ, van Emst-de Vries S, Nijtmans LGJ, Smeitink JAM, et al. Human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency: radical changes in mitochondrial morphology? **Am J Physiol Cell Physiol** [Internet]. 2007;293(1):C22-9.
  89. Willems PHGM, Smeitink JAM, Koopman WJH. Mitochondrial dynamics in human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency. **Int J Biochem Cell Biol**. 2009;41(10):1773–82.
  90. Bose A, Beal MF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson’s disease. **J Neurochem**. 2016;139:216–31.
  91. Hosamani R, Muralidhara. ACUTE EXPOSURE OF *Drosophila melanogaster* TO PARAQUAT CAUSES OXIDATIVE STRESS AND MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION. **Arch Insect Biochem Physiol**. 83(1):25-40.
  92. Cochemé HM, Murphy MP. Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. **J Biol Chem**. 2008;283(4):1786–98.
  93. Greenspan RJ, Dierick HA. “Am not I a fly like thee?” From genes in fruit flies to behavior in humans. **Hum Mol Genet**. 2004;13(REV. ISS. 2):267–73.
  94. Feany MB, Bender WW. A *Drosophila* model of Parkinson’s disease. **Nature**. 2000;404(March):394–8.
  95. Dabool L, Juravlev L, Hakim-Mishnaevski K, Kurant E. Modeling Parkinson’s disease in adult *Drosophila*. **J Neurosci Methods** [Internet]. 2019;311(October 2018):89–94.
  96. Hewitt VL, Whitworth AJ. Mechanisms of Parkinson’s Disease: Lessons from *Drosophila* [Internet]. 1st ed. Vol. 121, **Current Topics in Developmental Biology**. Elsevier Inc.; 2017. 173–200 p.
  97. Xiong Y, Yu J. Modeling Parkinson’s disease in *Drosophila*: What have we learned for dominant traits? **Front Neurol**. 2018;9(APR).
  98. Botella JA, Bayersdorfer F, Gmeiner F, Schneuwly S. Modelling Parkinson’s Disease in *Drosophila*. **NeuroMolecular Med**. 2009;11(4):268–80.
  99. Lee S-h, Min K-J. *Drosophila melanogaster* as a model system in the study of pharmacological interventions in aging. **Translational Medicine of Aging**. 2009;3:98-103.
  100. Lazzari F, Sandrelli F, Whitworth AJ, Bisaglia M. Antioxidant Therapy in Parkinson’s Disease: Insights from *Drosophila melanogaster*. **Antioxidants**. 2020;9(1):52.
  101. Whitworth AJ, Wes PD, Pallanck LJ, Sciences B, Sheffield S. *Drosophila* models pioneer a new approach to drug discovery for Parkinson ’ s disease REVIEWS. **Drug Discov Today**, 2006;11(3).

102. Krüger R. Genes in familial parkinsonism and their role in sporadic Parkinson's disease. **J Neurol Suppl.** 2004;251(6):2–6.
103. Park J, Lee SB, Lee S, Kim Y, Song S, Kim S, et al. Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin. **Nature.** 2006;441(7097):1157–61.
104. Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH, et al. Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. **Nature.** 2006;441(7097):1162–6.
105. Deng H, Dodson MW, Huang H, Guo M. The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in Drosophila. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2008;105(38):14503–8.
106. Park J, Kim Y, Chung J. Mitochondrial dysfunction and Parkinson's disease genes: Insights from Drosophila. **DMM Dis Model Mech.** 2009;2(7–8):336–40.
107. Ziviani E, Tao RN, Whitworth AJ. Drosophila Parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates Mitofusin. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2010;107(11):5018–23.
108. Hao LY, Giasson BI, Bonini NM. DJ-1 is critical for mitochondrial function and rescues PINK1 loss of function. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2010;107(21):9747–52.
109. Klein P, Müller-Rischart AK, Motori E, Schönbauer C, Schnorrer F, Winklhofer KF, et al. Ret rescues mitochondrial morphology and muscle degeneration of Drosophila Pink1 mutants. **EMBO J.** 2014;33(4):341–55.
110. Yang Y, Gehrke S, Imai Y, Huang Z, Ouyang Y, Wang J-W, et al. Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of Drosophila Pink1 is rescued by Parkin. **Proc Natl Acad Sci** [Internet]. 2006;103(28):10793–8.
111. Sulzer D, Schmitz Y. Parkinson's Disease: Return of an Old Prime Suspect. **Neuron.** 2007;55(1):8–10.
112. Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, Andrews LA, Feany MB, Pallanck LJ. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in Drosophila parkin mutants. **Proc Natl Acad Sci** [Internet]. 2003;100(7):4078–83.
113. Sun AY, Wang Q, Simonyi A, Sun GY. Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. **Mol Neurobiol.** 2010;41(2–3):375–83.
114. Surmeier DJ. Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. **Lancet Neurol.** 2007;6(10):933–8.
115. Park, J, Kim, SY, Cha, G-H, Lee, SB. Drosophila DJ-1 mutants show oxidative stress-sensitive locomotive dysfunction. **Gene.** 2005;361(1-2):133-9. 361.
116. Lee HS, Lee KS, Yu K, Hong SY. Expression of genes related to Parkinson's disease after paraquat treatment in Drosophila melanogaster. **Pestic Biochem Physiol.** 2008;92(1):19–23.
117. Worrell JW, Levine RB. Characterization of Voltage-Dependent Ca<sup>2+</sup> Currents in Drosophila Motoneurons In Situ. **J Neurophysiol** [Internet].

- 2008;100(2):868–78.
118. Xu K, Xu YH, Chen JF, Schwarzschild MA. Neuroprotection by caffeine: Time course and role of its metabolites in the MPTP model of Parkinson's disease. **Neuroscience** [Internet]. 2010;167(2):475–81.
  119. Pesah Y. Drosophila parkin mutants have decreased mass and cell size and increased sensitivity to oxygen radical stress. **Development** [Internet]. 2004;131(9):2183–94.
  120. Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, Andrews LA, Feany MB, Pallanck LJ. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in Drosophila parkin mutants. **Proc Natl Acad Sci** [Internet]. 2003;100(7):4078–83.
  121. Si H, Ma P, Liang Q, Yin Y, Wang P, Zhang Q, et al. Overexpression of pink1 or parkin in indirect flight muscles promotes mitochondrial proteostasis and extends lifespan in Drosophila melanogaster. **PLoS One**. 2019;14(11):1–11.
  122. Hedenstro A. How Insect Flight Steering Muscles Work. **PLoS Biol**, 2014;12(3):1–4.
  123. Dickinson MH. The initiation and control of rapid flight maneuvers in fruit flies. **Integr Comp Biol**. 2005;45(2):274–81.
  124. Hausmann M, Peduzzi M. Mechanical analysis of Drosophila indirect flight and jump muscles. **Texts Context Enferm**. 2009;18(2):258–65.
  125. Bossy-Wetzel E, Barsoum MJ, Godzik A, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. **Curr Opin Cell Biol**. 2003;15(6):706–16.
  126. Reedy MC, Beall C. Ultrastructure of Developing Flight Muscle in Drosophila. I. **Assembly of Myofibrils**. Dev Biol. 1993;160(July):443–4365.
  127. Rai M, Katti P, Nongthomba U. Drosophila Erect wing (Ewg) controls mitochondrial fusion during muscle growth and maintenance by regulation of the Opa1-like gene. **J Cell Sci** [Internet]. 2014;127(1):191–203.
  128. Sohal R. Aging changes in insect flight muscle. Gerontology. 1976;22:317–33.
  129. Flagg-newton JL. Department of Physiology and Biophysics, **University of Miami School of Medicine**, Miami, Florida 33101. 1980;1043–8.

**ANEXO A – CARTA DE ACEITE DA COMISSÃO CIENTÍFICA****SIPESQ**

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 9077

Porto Alegre, 28 de novembro de 2018.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica da ESCOLA DE CIÊNCIAS da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "ANÁLISE LOCOMOTORA, HISTOFISIOLÓGICA, ULTRAESTRUTURAL E NEUROMETABÓLICA DE *Drosophila melanogaster* COM PARKINSONISMO INDUZIDO POR PARAQUAT". Este projeto necessita da apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica da ESCOLA DE CIÊNCIAS

## ANEXO B – ARTIGOS PUBLICADOS NO PERÍODO DO MESTRADO

### 1) Artigo publicado no periódico *Brain Structure and Function* em 2019.

Brain Structure and Function (2019) 224:2857–2870  
<https://doi.org/10.1007/s00429-019-01943-4>

ORIGINAL ARTICLE



### Increases in dendritic spine density in BLA without metabolic changes in a rodent model of PTSD

Laura Tartari Neves<sup>1,2</sup> · Paula Fernanda Ribas Neves<sup>1,2</sup> · Lisie Valéria Paz<sup>1,2</sup> · Mariana Zancan<sup>3</sup> · Bruna Bueno Milanesi<sup>1</sup> · Gabriele Zenato Lazzari<sup>1</sup> · Rafaela Barboza da Silva<sup>1</sup> · Marina Mena Barreto Peres de Oliveira<sup>1</sup> · Gianina Teribele Venturin<sup>4</sup> · Samuel Greggio<sup>4</sup> · Jaderson Costa da Costa<sup>4</sup> · Alberto A. Rasia-Filho<sup>3</sup> · Régis Gemerasca Mestriner<sup>1,2</sup> · Léder Leal Xavier<sup>1,2</sup>

Received: 21 January 2019 / Accepted: 13 August 2019 / Published online: 22 August 2019  
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

#### Abstract

Imaging studies have shown abnormal amygdala function in patients with posttraumatic stress disorder (PTSD). In addition, alterations in synaptic plasticity have been associated with psychiatric disorders and previous reports have indicated alterations in the amygdala morphology, especially in basolateral (BLA) neurons, are associated with stress-related disorders. Since, some individuals exposed to a traumatic event develop PTSD, the goals of this study were to evaluate the early effects of PTSD on amygdala glucose metabolism and analyze the possible BLA dendritic spine plasticity in animals with different levels of behavioral response. We employed the inescapable footshock protocol as an experimental model of PTSD and the animals were classified according to the duration of their freezing behavior into distinct groups: “extreme behavioral response” (EBR) and “minimal behavioral response”. We evaluated the amygdala glucose metabolism at baseline (before the stress protocol) and immediately after the situational reminder using the microPET and the radiopharmaceutical <sup>18</sup>F-FDG. The BLA dendritic spines were analyzed according to their number, density, shape and morphometric parameters. Our results show the EBR animals exhibited longer freezing behavior and increased proximal dendritic spines density in the BLA neurons. Neither the amygdaloid glucose metabolism, the types of dendritic spines nor their morphometric parameters showed statistically significant differences. The extreme behavior response induced by this PTSD protocol produces an early increase in BLA spine density, which is unassociated with either additional changes in the shape of spines or metabolic changes in the whole amygdala of Wistar rats.

**Keywords** PTSD · Amygdaloid complex · Dendritic spines · <sup>18</sup>F-FDG · MicroPET

#### Introduction

According to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5), Posttraumatic stress disorder (PTSD) is a psychiatric condition classified in the “Trauma and Stressor-Related Disorders” category (American Psychiatric Association 2013). PTSD is a debilitating disorder that develops after exposure to a traumatic event which involves threatened death, serious injury or sexual violence. The psychophysiological symptoms of PTSD are associated with the traumatic event and include avoidance, negative thoughts and mood and alterations in arousal and reactivity. These symptoms persist more than a month and cause significant impairment in patients’ lives (American Psychiatric Association 2013; Shalev et al. 2017). In addition, DSM-5 recognizes a dissociative subtype of PTSD, where patients present

✉ Léder Leal Xavier  
 llxavier@puers.br

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Escola de Ciências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6681, Prédio 12C, Sala 104, Porto Alegre, Rio Grande do Sul CEP 90619-900, Brazil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Ciências Básicas/Fisiologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>4</sup> Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCer), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

2) Artigo publicado no periódico *Mechanisms of Ageing and Development*, em 2019.

Mechanisms of Ageing and Development 182 (2019) 111128



Contents lists available at ScienceDirect

## Mechanisms of Ageing and Development

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/mechagedev](http://www.elsevier.com/locate/mechagedev)

## Selective brain neuronal and glial losses without changes in GFAP immunoreactivity: Young versus mature adult Wistar rats

Leonardo D. Diene<sup>a</sup>, Zaquer S.M. Costa-Ferro<sup>b</sup>, Silvia Barbosa<sup>c</sup>, Bruna Bueno Milanese<sup>a</sup>, Gabriele Zenato Lazzari<sup>a</sup>, Laura Tartari Neves<sup>a</sup>, Lisiê Valéria Paz<sup>a</sup>, Paula Fernanda Ribas Neves<sup>a</sup>, Vanessa Battisti<sup>a</sup>, Lucas A. Martins<sup>a</sup>, Gunther Gehlen<sup>d</sup>, Régis Gemerascas Mestriner<sup>a</sup>, Jaderilson C. Da Costa<sup>b</sup>, Léder L. Xavier<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Escola de Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCer/RS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Histoфизиologia Comparada, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup> Universidade Feevale, Novo Hamburgo, RS, Brazil



## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Glia  
Neurons  
Astrocytes  
Ageing  
GFAP

## ABSTRACT

Normal ageing results in brain selective neuronal and glial losses. In the present study we analyze neuronal and glial changes in Wistar rats at two different ages, 45 days (young) and 420 days (mature adult), using Nissl staining and glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunohistochemistry associated to the Sholl analysis. Comparing mature adults with young rats we noted the former present a decrease in neuronal density in the cerebral cortex, corpus callosum, pyriform cortex, L.D.D.M., L.D.V.L., central medial thalamic nucleus and *zona incerta*. A decrease in glial density was found in the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. Additionally, the neuron/glia ratio was reduced in the central medial thalamic nucleus and increased in the habenula. No changes were found in the neuronal and glial densities or neuron/glia ratio in the other studied regions. The number of astrocytic primary processes and the number of intersections counted in the Sholl analysis presented no significant difference in any of the studied regions. Overall, neither GFAP positive astrocytic density nor GFAP immunoreactivity showed alteration.

## 1. Introduction

In humans and rodents, cognitive decline, memory loss and reduced learning ability are associated with brain ageing and losses of neuronal and glial cells throughout life, although in most cases there is no apparent major pathological component, in part, due to the action of healthy glial cells in protecting neurons and repairing damaged tissue in the central nervous system (CNS) (Chung et al., 2009; Tansey and Goldberg, 2010; Fabricius et al., 2013; Chinta et al., 2014; Lopez-Leon et al., 2014; Kalia and Lang, 2015; Ojo et al., 2015; Rodríguez-Arellano et al., 2016; Bellaver et al., 2016).

Among the glial cells, astrocytes are the most numerous in the brain (Pekny and Pekna, 2004), comprising as much as 25% of the cells and 35% of the total mass of the CNS (Eng et al., 1992). They perform key roles in normal brain physiology, including blood flow regulation, providing glucose and lactate to neurons, participating in synaptic function and plasticity, and maintaining the extracellular balance of

ions and fluids (Giaume et al., 2007; Rodríguez et al., 2009; Verkhatsky et al., 2012; Sofroniew and Vinters, 2010; Gomes et al., 2013). During the ageing process, astrocytes may react differently (through hyperplasia and/or reactive astrogliosis) in different brain regions, such as the striatum and the frontal cortex (Mythri et al., 2011; Eddleston and Mucke, 1993). Whilst there is no consensus regarding astrocytic density in humans, one study showed the number of astrocytes remains unchanged even in centenarian individuals (Fabricius et al., 2013).

By contrast, a previous study in rats showed the number of astrocytes and pericytes tends to increase by 20% in the cerebral cortex and other brain regions during ageing, while the number of oligodendrocytes and microglia remains unchanged (Cotrina and Nedergaard, 2002).

Ageing is also associated with increased glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression. GFAP is a reliable astrocytic marker and increased GFAP immunoreaction is generally accepted as a sign of

\* Corresponding author at: 6681 Ipiranga Avenue, Porto Alegre, RS, 90619-900, Brazil.  
E-mail address: [lxavier@puers.br](mailto:lxavier@puers.br) (L.L. Xavier).

<https://doi.org/10.1016/j.mad.2019.111128>

Received 25 March 2019; Received in revised form 18 July 2019; Accepted 6 August 2019  
Available online 09 August 2019

0047-6374/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.