

Respostas epigenéticas de *Daphnia magna* à ciprofloxacina

Epigenetic responses of Daphnia magna to ciprofloxacin

Beatriz Carvalho Lopes (113525)

Licenciatura em Biologia

Orientadora: Dr. Joana Luísa Lourenço Estevinho Pereira

Co-orientadora: Joana Isabel Marques dos Santos

|Julho 2025|

This work was developed under the specific scope of the project EPIBOOST, funded by the European Union through the Grant 101078991 - views and opinions expressed are however those of the authors only and do not necessarily reflect those of the EU or the European Research Executive Agency; neither the EU or the granting authority can be held for them.



Resumo

A presença crescente de fármacos em ecossistemas aquáticos, nomeadamente antibióticos como a ciprofloxacina, tem levantado preocupações ambientais e de saúde pública, devido à sua persistência e potenciais efeitos adversos.

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos da ciprofloxacina na metilação global do DNA em *Daphnia magna*, um organismo modelo que desempenha um papel fundamental na investigação de processos ecológicos e na proteção da saúde ambiental, e explorar possíveis relações entre alterações epigenéticas e alterações fenotípicas, nomeadamente na taxa de alimentação.

A exposição de *D. magna* decorreu durante 48 horas, sendo utilizada uma concentração ecotoxicologicamente relevante (Concentração que provoca imobilização em 20% dos indivíduos expostos durante 48 h - EC₂₀ = 19,57 mg/L) de ciprofloxacina. Após o ensaio, extraiu-se DNA e RNA das amostras obtidas. A metilação global do DNA foi quantificada por ELISA, e os efeitos fenotípicos foram avaliados através de ensaios de inibição da taxa de alimentação. Os resultados obtidos indicaram que, nas condições testadas, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controlo e exposto, tanto a nível epigenético, como fenotípico. A ausência de efeitos significativos pode estar relacionada com limitações experimentais, como a curta duração da exposição, a baixa solubilidade da ciprofloxacina no meio ASTM e a utilização de um método global de deteção de metilação, pouco sensível a alterações locus-específicas. Assim, os resultados não excluem a possibilidade de alterações epigenéticas mais leves ou localizadas, algo que será confirmado num futuro próximo após a sequenciação de todo o genoma com técnicas que possibilita a deteção das citosinas metiladas e da sua posição no genoma. Paralelamente, o transcriptoma obtido através de RNAseq será também analisado por forma a esclarecer o papel da metilação na regulação da expressão genética em resposta à exposição a ciprofloxacina.

Desta forma, este estudo contribui para a compreensão do impacto dos antibióticos em organismos aquáticos e reforça a importância da utilização de metodologias mais sensíveis e abordagens complementares em trabalhos futuros.

Palavras-Chave

Epigenética; *Daphnia magna*; Ciprofloxacina; Metilação do DNA; Efeitos fenotípicos

Abstract

The growing presence of pharmaceuticals in aquatic ecosystems, particularly antibiotics such as ciprofloxacin, has raised environmental and public health concerns due to their persistence and potential adverse effects.

This study aimed to investigate the effects of ciprofloxacin on global DNA methylation in *Daphnia magna*, a model organism that has key role in investigating ecological processes and protecting environmental health, and to explore possible relationships between epigenetic alterations and phenotypic changes, particularly in feeding rate.

Exposure of *D. magna* was carried out for 48 hours, using an ecotoxicologically relevant concentration (the concentration estimated to elicit 20% of immobilization of exposed organisms in 48 h - $EC_{20} = 19,57$ mg/L) of ciprofloxacin. Following the exposure, DNA and RNA were extracted from the samples. Global DNA methylation was quantified by ELISA, and phenotypic effects were assessed using a post-exposure feeding inhibition assay. The results obtained indicated that, under the tested conditions, there were no significant differences between the control and exposed groups, either epigenetically or phenotypically. The absence of significant effects may be related to experimental limitations, such as the short duration of the exposure, the low solubility of ciprofloxacin in ASTM medium and the use of a global methylation detection method, which is not sensitive to locus-specific changes. Thus, the results do not exclude the possibility of subtle or localized epigenetic changes, which is to be confirmed in the near future with the analysis of whole genome methylation sequencing data applied to the DNA samples. The whole transcriptome will also be inspected over RNAseq data in the near future to clarify the role of methylation in regulating gene expression responses to ciprofloxacin stress.

The present study thus contributes to the understanding of the impact of antibiotics on aquatic organisms and reinforces the importance of more sensitive methodologies and complementary approaches in future epigenetic investigations.

Key words

Epigenetics; *Daphnia magna*; Ciprofloxacin; DNA Methylation; Phenotypic Effects

Índice

1. Introdução.....	6
2. Materiais e Métodos	12
2.1. Espécie e condições de cultura	12
2.2. Ciprofloxacina	12
2.3. Exposições.....	12
2.3.1. Exposição para a extração de DNA e RNA	12
2.3.2. Exposição para subsequente teste de inibição alimentar.....	13
2.4. Extração de DNA e RNA.....	13
2.5. Ensaio	14
2.5.1. Determinação da % total de citosinas metiladas	14
2.5.2. Determinação da inibição da taxa de filtração após exposição.....	14
2.6. Análise estatística.....	15
3. Resultados.....	16
4. Discussão.....	18
5. Conclusão e perspectivas futuras	21
6. Bibliografia.....	23

1. Introdução

As águas residuais e os efluentes das estações de tratamento de águas residuais (ETARs) são reconhecidamente uma fonte de contaminação por fármacos nos ecossistemas aquáticos, representando, assim, preocupações específicas quanto à sua influência na qualidade dos ambientes aquáticos (Fent et al., 2006). Essa contaminação pode ter três origens específicas principais: águas residuais urbanas/domésticas e hospitalares; águas residuais agropecuárias que transportam medicamentos veterinários; e resíduos da produção industrial (Santos, 2010).

Os produtos farmacêuticos de uso humano entram no meio ambiente principalmente por meio da excreção de compostos ativos ou metabólitos, através da urina e fezes, e pelo descarte inadequado de medicamentos (Fent et al., 2006). Diversos estudos relataram a presença de antibióticos em diferentes compartimentos aquáticos, incluindo efluentes de ETARs, sedimentos, águas superficiais, subterrâneas e água do mar (por exemplo, Fent et al., 2006; Maghsodian et al., 2022; Oharisi et al., 2023; Viana et al., 2021).

No caso dos medicamentos veterinários, a aplicação de fármacos em criações intensivas de animais gera resíduos que podem ser transportados para sistemas aquáticos por meio de escoamento superficial ou infiltração no solo. A prática de utilizar estrume contaminado em campos agrícolas também contribui para a percolação de substâncias químicas em águas subterrâneas e superficiais (Fent et al., 2006).

Para o tratamento de águas residuais, a adsorção tem sido utilizada há muito tempo como um método convencional para remover poluentes de matrizes de água. No entanto, a sua eficácia depende fortemente de fatores como: propriedades físico-químicas do adsorvente, o pH da solução e os solutos (Ghosh et al., 2023; Kumar et al., 2023; Fent et al., 2006). No entanto, independentemente da origem, muitos produtos farmacêuticos que alcançam as ETARs, não são devidamente degradados ou removidos, resultando na contaminação das águas superficiais, como rios, lagos e estuários. Deste modo, diversos estudos abordam a ineficácia das ETARs na remoção de fármacos e exploram métodos alternativos para a sua degradação em águas residuais, a fim de mitigar os seus impactos ambientais (Gaudino et al., 2021; Ghosh et al., 2023; Idrees et al., 2025; Kumar et al., 2023).

Neste contexto, no estudo de Rodriguez Mozaz et al. (2020) examinaram-se ETARs onde se quantificaram resíduos de pelo menos 7 a 12 antibióticos distintos, cada um em concentrações que variam de 3 a 598 ng/L e que são continuamente descarregados em ecossistemas de água doce e marinhos. Embora os níveis detetados de antibióticos libertados no ambiente tenham sido no geral avaliados como apresentando um impacto ambiental moderado, antibióticos como, a ciprofloxacina (composto abordado no presente trabalho) podem constituir uma ameaça significativa nos ecossistemas (Rodriguez Mozaz et al., 2020).

A presença de antibióticos, como a ciprofloxacina nos ecossistemas aquáticos representa uma ameaça para a saúde humana devido ao potencial desenvolvimento de resistência antibacteriana (Fent et al., 2006; Kümmerer, 2003). A utilização excessiva e recorrente da ciprofloxacina tem contribuído para a sua persistência no meio aquático, favorecendo o aparecimento de bactérias resistentes a antibióticos e a transmissão de genes de resistência a antibióticos entre humanos e outros seres vivos (Anjali & Shanthakumar, 2019; Duarte et al.,

2022). Para além destes perigos indiretos para a saúde humana, a presença de ciprofloxacina e outros antibióticos nas águas residuais tem um impacto direto nos organismos aquáticos, que são constantemente expostos a resíduos de fármacos ao longo de toda a sua vida, interferindo em processos biológicos essenciais (Fent et al., 2006).

Ciprofloxacina

A ciprofloxacina [ácido 1-ciclo-propil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolina carboxílico] é um antibiótico amplamente utilizado para o tratamento de infeções bacterianas, devido ao seu amplo espectro de ação. Pertence à classe química das fluoroquinolonas (Chin et al., 1984; Zeiler et al., 1984) e destaca-se pela sua estrutura química diferenciada (Figura 1), com um grupo ciclopropil na posição 1 da molécula, substituindo o grupo etilo, o que potencia a sua ampla atividade antimicrobiana, sendo capaz de inibir cocos e bacilos aeróbios e anaeróbios em baixas concentrações (Chin et al., 1984; Zeiler et al., 1984).

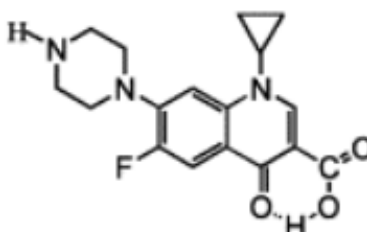


Figura 1. Estrutura química da ciprofloxacina.
(Fonte: Park et al., 2002)

Este antibiótico é comumente prescrito para tratar infeções de pele, pulmões, vias aéreas, ossos e articulações causadas por bactérias suscetíveis, bem como infeções urinárias causadas por algumas bactérias como *Escherichia coli* e diarreias infecciosas causadas por *E. coli*, *Campylobacter jejuni* e *Shigella sp.* (Eliopoulos et al., 1984; Zeiler et al., 1984).

A ciprofloxacina apresenta alta capacidade de penetração nos tecidos, atingindo altos níveis de distribuição no organismo independentemente da via de administração (pode ser oral ou intravenosa). A absorção do composto é geralmente rápida (Turnidge, 1999), sendo a sua meia-vida no ser humano de 3 a 5 horas após uma única dose de administração e é eliminada principalmente por excreção renal (Bergan et al., 1988).

O mecanismo de ação da ciprofloxacina baseia-se na inibição da topoisomerase IV e da DNA girase, enzimas essenciais para a replicação, transcrição e reparação do DNA bacteriano. A topoisomerase IV controla a topologia do DNA criando quebras temporárias na cadeia dupla. Essa interrupção impede a divisão celular bacteriana e resulta na morte das células infecciosas (Drlica & Zhao, 1997).

A ciprofloxacina tem sido encontrada em ETARs e em ecossistemas aquáticos. Por exemplo, foi detetada no rio Mondego, em Coimbra, Portugal, com níveis que variavam entre 67 e 119,2 ng/L (Pena et al., 2007). Além disso, foram encontradas concentrações elevadas de antibióticos da família das fluoroquinolonas (com níveis de ciprofloxacina que atingiram até 11 000 ng/L) nos efluentes hospitalares de Coimbra, bem como nos afluentes/efluentes das ETARs locais,

evidenciando dependência sazonal e remoção incompleta por meio do tratamento estabelecido (Seifrtová et al., 2008).

Neste contexto geral, a Comunidade Europeia tem vindo a implementar diversas diretivas com o objetivo de prevenir, acompanhar e avaliar os potenciais efeitos nocivos associados a estes contaminantes, tornando-se fundamental determinar as concentrações que podem representar risco para os ecossistemas. Essa informação é crucial para o desenvolvimento de regulamentações ambientais eficazes, tanto para autorizar a comercialização de produtos como para controlar as descargas de efluentes. Exemplos desses regulamentos são o REACH (Registo, Avaliação, Autorização e Restrição de Substâncias Químicas) e a Diretiva-Quadro da Água (Directiva 2000/60/CE), que estabelece um quadro de ação comunitária para alcançar o bom estado das massas de água, incluindo mais recentemente a gestão de contaminantes de preocupação emergente como a ciprofloxacina. Estas regulamentações exigem dados ecotoxicológicos que indiquem os níveis em que as substâncias causam efeitos adversos, recorrendo frequentemente a organismos modelo como a *Daphnia magna* para essas avaliações.

Daphnia magna

Os organismos do género *Daphnia*, vulgarmente conhecidos como “pulga d'água”, são pequenos crustáceos planctónicos com uma distribuição geográfica muito ampla. Este género integra a ordem Cladocera e a classe Branchiopoda, considerando a morfologia dos apêndices torácicos. Existem mais de 100 espécies de *Daphnia* descritas, cada uma com uma arquitetura corporal bastante semelhante entre si (Ebert, 2005; Ebert, 2022). Entre elas, *Daphnia magna* é talvez a espécie de cladóceros mais usada como organismo modelo e mais recomendada para ensaios ecotoxicológicos padronizados (ex.: OECD 1998, OECD 2004).

Estes organismos possuem um corpo semi-transparente, característica que contribui para a sua camuflagem, evitando a deteção por predadores visuais, como peixes planctívoros. Ao longo do desenvolvimento, passam por quatro a seis mudas até atingirem a maturidade, mantendo posteriormente um crescimento contínuo através de mudas periódicas. As dáfnias recém-nascidas apresentam uma morfologia semelhante à dos adultos, no entanto não possuem a bolsa dorsal bem desenvolvida típica das fêmeas adultas (Ebert, 2022).

As dáfnias são frequentemente encontradas em água doce, atuando como principal consumidor primário. Desempenham um papel central nas cadeias tróficas aquáticas, pois são filtradores de pequenas partículas em suspensão, em particular algas unicelulares e servem de alimento para peixes e diversos predadores invertebrados (Ebert, 2022).

Tipicamente, as dáfnias são bem conhecidas pela sua capacidade de se reproduzir assexuadamente por partenogénese, permitindo a produção de ovos diploides que se desenvolvem em novas fêmeas geneticamente idênticas à progenitora, sem necessidade de fertilização. Este modo de reprodução assexuada pode ser mantido durante longos períodos em condições favoráveis. O crescimento das fêmeas ocorre por meio de sucessivas mudas do exoesqueleto cuticular, cuja frequência é dependente das condições de temperatura e de

recursos alimentares disponíveis (Threlkeld, 1987). Após a maturação do sistema reprodutor (Threlkeld, 1987), a deposição de ovos ocorre ciclicamente ao longo da vida da fêmea, em intervalos regulares de aproximadamente 3 dias; esses ovos desenvolvem-se completamente e os neonatos resultantes são libertados para o meio exterior (Zaffagnini, 1987). No entanto, quando o ambiente se torna instável ou condições ambientais se deterioram e se tornam desfavoráveis para o crescimento da população, as dáfrias são capazes de optar por uma reprodução sexuada (Ebert, 2022), gerando diversidade genética necessária ao seu sucesso a longo prazo. Neste cenário, as populações produzem machos (assexuadamente) e, de seguida, ovos haploides que requerem fertilização (Galimov et al., 2011; Yampolsky, 1992). Os ovos fertilizados pelos machos começam a desenvolver-se, mas depois passam por um período de dormência através da formação de uma estrutura de resistência chamada “ephippium”, composta por um invólucro e pelos embriões em repouso (Ebert, 2022; Hebert, 1987). Desta forma, as populações de dáfrias conseguem sobreviver a condições ambientais extremas, como secas temporárias, baixas temperaturas, predação, parasitismo ou condições tóxicas da água. Os embriões em fase de repouso podem permanecer viáveis durante muitos anos nos sedimentos de lagoas, uma vez que são altamente resistentes à seca e ao frio (Ebert, 2022). Esta estratégia reprodutiva de alternância entre reprodução assexuada e sexuada confere vantagens adaptativas a curto e a longo prazo tanto em termos de crescimento populacional acelerado como na capacidade de resposta rápida a pressões seletivas (Ebert, 2022; Lynch & Gabriel, 1983; Taylor et al., 1999).

São vários os estímulos ambientais que, atuando isoladamente ou em combinação, não só podem induzir alterações em vários parâmetros do ciclo reprodutivo assexuado, como são potenciadores da reprodução sexuada em *Daphnia*. Fatores físicos como a temperatura e o fotoperíodo funcionam como indicadores de condições climáticas adversas, enquanto a densidade populacional afeta a disponibilidade de alimento, incentivando o investimento em estratégias de competição interespecífica (Gyllström & Hansson, 2004; Kleiven et al., 1992; Korpelainen, 1986; Stibor & Lampert, 2000). Neste contexto, estas estratégias referem-se principalmente às consequências ecológicas da limitação de recursos, como a redução da fecundidade e do crescimento da *Daphnia*, resultantes da elevada densidade populacional (Boersma, 1995).

A combinação de características únicas, como ciclo de vida curto, sensibilidade a diferentes fatores de stress, facilidade de cultivo e relevância ecológica, posiciona *D. magna* como um organismo modelo inestimável para estudos ambientais. Além de contribuir para a compreensão dos impactos de contaminantes químicos, *D. magna* desempenha um papel fundamental na investigação de processos ecológicos e na proteção da saúde ambiental.

Efeitos da ciprofloxacina em *Daphnia sp.*

Vários estudos demonstraram que *Daphnia sp.* é sensível à exposição a ciprofloxacina, com efeitos documentados em diferentes parâmetros biológicos, como a reprodução e o crescimento. A Tabela 1 ilustra a sensibilidade deste organismo modelo a diferentes níveis do contaminante, reforçando a sua utilidade na avaliação de risco ecotoxicológico.

Tabela 1: Síntese de alguns estudos, onde se demonstram diferentes efeitos da exposição a ciprofloxacina em *Daphnia* sp.

Espécie	Parâmetro	Concentração de efeito	Referência
<i>Daphnia magna</i>	Imobilização (48 h)	0,08714 mg/L	Dalla Bona et al., 2014
<i>Daphnia curvirostris</i>	Imobilização (48 h)	0,01445 mg/L	Dalla Bona et al., 2014
<i>Daphnia magna</i>	Imobilização (48 h)	0,06 mg/L	Yisa et al., 2023
<i>Daphnia magna</i>	Reprodução (21 dias)	30 mg/L	Dalla Bona et al., 2015
<i>Daphnia magna</i>	Fecundação (21 dias)	8,82 mg/L	Martins et al., 2012
<i>Daphnia magna</i>	Tamanho dos neonatos da 1ª ninhada (21 dias)	3,05 mg/L	Martins et al., 2012
<i>Daphnia magna</i>	Crescimento (21 dias)	15 mg/L	Martins et al., 2012
<i>Daphnia magna</i>	Stress Oxidativo (48 h)	10,000 µg/L	Yisa et al., 2023
<i>Daphnia magna</i>	Stress Oxidativo (21 dias)	0,013 e 0,078 mg/L	Nunes et al., 2018
<i>Daphnia magna</i>	Genotoxicidade (21 dias)	> 0,013 mg/L	Nunes et al., 2018
<i>Daphnia magna</i>	Stress Oxidativo (48 h)	2,563; 5,125; 10,25 e 20,50 mg/L	Dionísio, et al., 2020
<i>Daphnia magna</i>	Comportamento (21 dias)	0,005 e 0,0125 mg/L	Dionísio, et al., 2020

Alterações epigenéticas como biomarcadores

Os ambientes aquáticos são complexos e apresentam múltiplos fatores de stress, tanto abióticos quanto bióticos que interagem com os organismos vivos. Para se adaptarem a essas pressões, os organismos aquáticos, como *D. magna*, utilizam estratégias epigenéticas que ajudam a modular o fenótipo, através da regulação da expressão gênica. Essas estratégias alteram os perfis de expressão gênica e consequentemente as funções dos genes, permitindo que os organismos enfrentem desafios como mudanças climáticas e cenários de contaminação (Poloczanska et al., 2013; Silvestre et al., 2012).

A epigenética é o estudo de modificações hereditárias na expressão gênica que ocorrem sem modificar a sequência de DNA. Entre os principais mecanismos epigenéticos destacam-se a metilação do DNA, as modificações de histonas e a ação de RNA não codificante, sendo que todos respondem a estímulos ambientais (Bernstein et al., 2007; Bird, 2007; Goldberg et al., 2007; Jaenisch & Bird, 2003; Jeremias et al., 2018).

A metilação do DNA é o mecanismo epigenético mais amplamente investigado (Vandegheuchte et al., 2010), que consiste na transferência de um grupo metil para a quinta posição de uma citosina (embora outras bases de DNA também possam ser alvo de metilação), catalisada por uma família de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs) (Lindeman et al., 2019; Moore et al., 2013). Entre estas, a DNMT1 é responsável por preservar os padrões de metilação durante a replicação celular e a DNMT3 introduz metilações de novo em citosinas não metiladas

(Cavalli & Heard, 2019; Lyko, 2018; Nguyen et al., 2021). Sabe-se atualmente que a metilação do DNA pode facilitar o surgimento de mutações no genoma, sendo que as citosinas metiladas apresentam taxas de mutação mais elevadas do que as citosinas não metiladas (Denissenko et al., 1997; Jeremias et al., 2018). Em contrapartida, os padrões de metilação de DNA podem ser alterados por um processo de desmetilação, mediado por enzimas de translocação (Ten-Eleven Translocation - TET), que permite a remoção ativa destes grupos metil (oxidação de 5-metilcitosina em 5-hidroximetilcitosina), e que desempenha também um papel importante na regulação da expressão gênica (Ito et al, 2010; Tahiliani et al, 2009).

Num contexto em que as atividades antropogênicas exercem impactos cada vez mais intensos sobre os ecossistemas, compreender de que forma os epigenomas de organismos (tanto humanos quanto não humanos) reagem a pressões ambientais torna-se indispensável. Permite compreender mecanisticamente os efeitos da exposição aos diferentes agentes de stress e eventualmente encontrar bioindicadores que permitam identificar a presença de determinados fatores de stress e/ou prever os efeitos dessa exposição a escalas de organização biológica superiores, uma vez que se consiga relacionar de forma estável uma determinada alteração epigenética com alterações específicas nos padrões de expressão genética associada e consequências nos fenótipos resultantes. Assim, analisar e integrar essas respostas moleculares é fundamental para a caracterização dos riscos ecológicos impostos por contaminantes, apoiando a definição de critérios de proteção mais eficazes no âmbito da Avaliação de Risco Ecológico (Jeremias et al., 2020).

Neste contexto, *D. magna* é amplamente utilizada como modelo epigenético e as suas linhagens clonais, geneticamente idênticas, oferecem uma vantagem única de distinguir influências genéticas de epigenéticas no fenótipo. Isso é essencial para estudar como os fatores ambientais afetam a expressão gênica ao longo de gerações (Harris, 2012). Um dos principais mecanismos epigenéticos é a metilação de citosinas no contexto dos dinucleótidos CpG, geralmente associada ao silenciamento de genes (Hearn, 2021). Em *D. magna*, os níveis de metilação da citosina são relativamente baixos, com média de cerca de 1% em todo o genoma, sendo que regiões específicas, como os exões, apresentam uma maior metilação em termos relativos (Hearn, 2021; Kvist et al., 2018; Vandegehuchte et al., 2010).

Objetivos

O presente estudo visa investigar os efeitos da ciprofloxacina na metilação global do DNA em *Daphnia magna* e estabelecer uma possível relação entre alterações neste mecanismo epigenético e efeitos fenotípicos registrados na sequência da exposição ao contaminante. O efeito fenotípico abordado no presente trabalho foi a inibição da taxa de alimentação de *D. magna* após exposição à ciprofloxacina por um período de 48 horas.

O trabalho aqui apresentado é parte de um projeto mais alargado, em que os padrões de alteração na metilação ao nível dos genes serão analisados, bem como a sua relação com alterações no transcriptoma e com um conjunto mais alargado de parâmetros fenotípicos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Espécie e condições de cultura

Os indivíduos de *D. magna* utilizados no trabalho pertencem ao clone BEAK, estabelecido a longo termo no laboratório. A cultura foi mantida em recipientes de vidro de 800 mL, com meio ASTM (ASTM, 1980), aditivado com extrato de algas (*Ascophyllum nodosum*; 6 mL) e alimentadas com suspensões de algas verdes (*Raphidocelis subcapitata*; 3×10^5 células/mL). Todas as semanas estas culturas eram monitorizadas, mudando o meio três vezes por semana, altura em que os animais eram também alimentados, de forma a terem as condições necessárias para o seu crescimento. Em cada um dos frascos eram mantidos cerca de 30 organismos tendo em consideração a capacidade de carga do sistema. A renovação das culturas foi efetuada utilizando uma das três ninhadas ideais para garantir a ausência de efeitos maternos (n3; n4; n5). As culturas foram mantidas numa câmara de temperatura controlada a 20°C e fotoperíodo 16^L: 8^D (16 horas de luz / 8 horas de escuro).

2.2. Ciprofloxacina

A ciprofloxacina (CAS number 85721-33-1; Sigma-Aldrich, Portugal) utilizada no estudo apresentava pureza 98%. A concentração de ciprofloxacina testada foi definida com base num teste agudo realizado anteriormente (OECD, 2004), correspondendo à concentração estimada de ciprofloxacina que causa a imobilização de 20% da população de *D. magna* em comparação com um grupo controlo. Assim, as soluções-teste do grupo exposto foram preparadas com uma concentração de 19,57 mg/L de ciprofloxacina dissolvida em meio de cultura.

De forma a mitigar a dificuldade em dissolver a ciprofloxacina, utilizou-se primeiramente um banho de ultrassons (3 imersões de 10 segundos) e depois levou-se o balão volumétrico com a solução, revestido/envolvido em papel de alumínio, ao agitador magnético, por cerca de 1 h e 30 min.

2.3. Exposições

Todos os ensaios foram iniciados com neonatos com idades inferior a 24 h, recolhidos entre a terceira e quinta ninhada das culturas de laboratório. As exposições tiveram uma duração de 48 h, durante as quais os animais não foram alimentados, com uma fase anterior de 4 dias de crescimento em condições iguais à manutenção da cultura, havendo renovação do meio após 2 dias. Estes ensaios foram realizados sob um fotoperíodo de 16^L: 8^D e uma temperatura de 20 ± 2°C.

2.3.1. Exposição para a extração de DNA e RNA

Na fase de crescimento do ensaio (4 dias) foram usados cerca de 260 organismos distribuídos por 4 frascos com meio ASTM (800 mL), extrato de algas castanhas e alimento. Posteriormente

seguiu-se para a fase de exposição (48 h), sem extrato nem alimento. Foram utilizados 3 frascos para o controlo, apenas com meio ASTM, e 3 frascos para o exposto, com a solução de ciprofloxacina previamente preparada (vide secção 2.1), sendo que cada frasco (réplica) continha 40 organismos. Após as 48 h de exposição procedeu-se à recolha dos organismos submetidos ao tratamento controlo e ao tratamento de ciprofloxacina para a posterior extração de DNA e RNA – estas amostras foram usadas em outros trabalhos para sequenciação de nova geração dos genomas e transcriptomas, exceto para uma parte das amostras de DNA, que foram usadas na determinação da % total de citosinas metiladas (secção 2.4.1).

Para fazer a recolha dos organismos no final do ensaio, utilizou-se um sistema de filtração gentil com uma rede previamente esterilizada para capturar os organismos. As dáfnias foram lavadas com água ultrapura para a remoção de resíduos. Posteriormente foram transferidas para microtubos Eppendorf estéreis de 1,5 mL, sendo recolhidas 10 dáfnias em cada microtubo, constituindo assim amostras destinadas à extração de DNA e RNA separadamente. Cada réplica de cada grupo experimental deu origem a duas amostras para extração de DNA e duas para extração de RNA, totalizando quatro amostras por réplica por condição. Nos microtubos destinados à extração de RNA, foram adicionados 100 µl de RNA-*later* para preservar a integridade deste ácido nucleico. Para garantir a preservação adequada as amostras passaram por um arrefecimento gradual, sendo primeiramente armazenadas no congelador a uma temperatura de -20°C e seguidamente armazenadas a -80°C até posterior processamento.

2.3.2. Exposição para subsequente teste de inibição alimentar

Na fase de cultivo antes da exposição cerca de 80 neonatos foram mantidos em frascos com meio ASTM e alimento durante 4 dias, com renovação de meio e alimentação conforme descrito para as culturas. Posteriormente prosseguiu-se para a exposição (48 h) com 2 frascos (800 mL) de controlo e 2 frascos (800 mL) do grupo exposto, cada um com 20 dáfnias. O grupo de exposição era constituído por solução de ciprofloxacina (1,6 L) preparada em ASTM previamente. O grupo de controlo apenas era constituído por meio ASTM não contaminado. Em ambos os grupos não foi adicionado nem algas nem extrato durante a exposição.

2.4. Extração de DNA e RNA

A extração de DNA das amostras foi feita com o kit MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit (Lucigen/Epicentre), seguindo o protocolo do fabricante para extração de DNA a partir de tecidos animais, com algumas adaptações implementadas para otimizar o rendimento e a qualidade do DNA em amostras de *D. magna*. As principais modificações incluíram a adição fracionada da solução de lise (Tissue and Cell Lysis Solution com Proteinase K), com 150 µL adicionados a cada amostra antes da homogeneização, e posteriormente mais 150 µL da mesma solução; na segunda lavagem do DNA precipitado, o etanol foi cuidadosamente adicionado à parede do tubo, do lado oposto ao *pellet*, com o objetivo de evitar a sua perturbação e deslocação; no passo final do protocolo eluiu-se o DNA em 37 µL de água ultrapura em vez do tampão TE, e as amostras foram armazenadas a 4 °C até ao dia seguinte, com o objetivo de facilitar a completa dissolução do DNA.

Para a extração de RNA seguiu-se o protocolo original de extração de RNA em tecidos animais do RNeasy[®] Plus Mini Kit (QIAGEN). Antes de iniciar a extração, o RNA-*later* usado na conservação do material após a exposição foi retirado de cada amostra recorrendo a uma centrifugação seguida de remoção por pipetagem do sobrenadante. No final do protocolo, fez-se a eluição do RNA em 37 µL de RNase-free Water e armazenaram-se as amostras a -80 °C. Todo o protocolo de extração foi realizado na câmara de fluxo laminar para evitar a contaminação das amostras com RNases.

Ambas as amostras (DNA e RNA) foram posteriormente enviadas para sequenciação, sendo que foi guardada uma alíquota das amostras de DNA para a realização do ensaio para a determinação da % total de citosinas metiladas (secção 2.5.1).

2.5. Ensaio

2.5.1. Determinação da % total de citosinas metiladas

Para avaliar os níveis globais de metilação do DNA, foi utilizado o MethylFlash™ Global DNA Methylation (5-mC) ELISA Easy Kit (Colorimetric) (EpigenTek), um método colorimétrico sensível e específico para a deteção de 5-metilcitosina. Este método baseia-se na ligação do DNA a uma membrana de alta afinidade com DNA presente no fundo dos poços de uma microplaca, sendo feita a deteção colorimétrica da fração metilada do DNA utilizando anticorpos de captura e deteção específicos para 5-mC. O ensaio foi realizado em seis amostras de DNA, sendo três do grupo controlo e três do exposto, seguindo o protocolo do fabricante.

No final do protocolo, a absorvância foi medida com recurso a um leitor de microplacas (Biotek Synergy H1 Microplate Reader com Gen 5 Software 3.05) a uma absorvância de 450 nm, em três intervalos de tempo diferentes (2, 8 e 15 minutos) e a percentagem de metilação foi calculada a partir de uma curva padrão, utilizando soluções com concentrações conhecidas (0,1%; 0,2%; 0,5%; 1%; 2%; 5% de 5-mC). A percentagem de 5-mC é proporcional à intensidade da absorvância medida e foi calculada utilizando a Equação 1, derivada da regressão da curva padrão, em que S representa a quantidade de DNA da amostra em ng.

Equação 1:

$$5mC\% = \frac{(b^2 + 4aY)^{0,5} - b}{2a} \div S \times 100\%$$

2.5.2. Determinação da inibição da taxa de filtração após exposição

Após 48 h de exposição (secção 2.3.2), deu-se início a um ensaio de filtração, em que foram utilizados frascos de 50 mL contendo meio ASTM suplementado com alimento, conforme as condições de cultura padrão. O ensaio foi dividido em três grupos experimentais: o grupo controlo, composto por 5 frascos-réplica contendo meio ASTM com algas e 4 dáfnias não expostas em cada frasco; o grupo de exposição, composto por 5 frascos-réplica contendo meio

ASTM com algas e 4 dáfias expostas à ciprofloxacina por frasco; e por último o grupo branco, composto por 8 frascos-réplica contendo apenas o meio ASTM com algas, mas sem dáfias.

Primeiramente introduziu-se nos frascos apenas meio ASTM e algas, estes foram levemente agitados e mediu-se a absorvância a 440 nm (foram utilizadas cuvetes de 3,2 mL) com recurso a um espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800 UV-Vis). Estes valores foram registados para gerar uma média da absorvância inicial das soluções de teste em todos os grupos testados. Seguidamente, adicionou-se as dáfias nos grupos respetivos, e o teste foi mantido no escuro a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 4 h. Após esse período, as dáfias foram retiradas dos frascos. O conteúdo líquido restante foi homogeneizado por agitação manual e 3,2 mL foram transferidos para cuvetes. Os valores de absorvância a 440 nm foram registados para cada réplica de cada grupo em teste. Os valores de absorvância obtido no início e no final do teste foram convertidos em densidade celular através de uma curva de calibração previamente construída no laboratório (Equação 2). De seguida, foi calculada a taxa de alimentação das dáfias testadas através da redução da densidade celular observada após 4 h de ensaio, utilizando a Equação 3.

Equação 2:

$$\text{Densidade (cells/ml)} = 6931 + (23179166 \times \text{ABS}(440 \text{ nm})) - (9972459 \times \text{ABS}(440 \text{ nm})^2)$$

Equação 3:

$$\text{Taxa} = \frac{\Delta \text{ células}}{\text{Tempo (4h)}}$$

2.6. Análise estatística

Para determinar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre os valores obtidos para os dois grupos experimentais (controlo e exposto) de cada ensaio, utilizou-se o software Microsoft Excel para aplicação do Teste t de Student, em que se assumiu como hipótese nula (H_0), que a média do controlo é igual à média do exposto, sendo a hipótese alternativa (H_1) o oposto (ou seja, há diferenças entre ambas). Para um $p \leq 0,05$ rejeitaríamos a nossa H_0 .

Antes da aplicação do Teste t, foi realizada uma análise preliminar dos dados, incluindo um teste de normalidade (Shapiro-Wilk), para verificar a distribuição dos dados, e um teste de homogeneidade de variâncias, para confirmar a igualdade de variâncias entre os grupos, com o intuito de validar os pressupostos necessários para a utilização do teste paramétrico.

Para aqueles dados que não seguiam uma distribuição normal (rejeitou-se a normalidade através do teste de Shapiro-Wilk) foi aplicado um teste estatístico não paramétrico (Teste U de Mann-Whitney).

3. Resultados

A Figura 2 mostra a curva padrão obtida com base em concentrações conhecidas de metilação (0,1% e 5% de 5-mC). A relação entre a concentração de 5-mC e a absorvância a 450 nm (ΔOD) foi descrita por um modelo de regressão quadrática, com a seguinte equação: $y = -0,1813x^2 + 1,1006x + 0,7215$, melhor do que por um modelo de regressão linear. A curva obtida serviu para transformar os valores de absorvância das amostras de DNA em estimativas da percentagem de metilação global do DNA. Embora o coeficiente de determinação baixo ($R^2 = 0,4389$), indicando uma dispersão grande dos dados em relação ao modelo (pontos afastados da linha da curva), a curva revela um aumento inicial da absorvância até aproximadamente 2% de 5-mC, seguido de uma ligeira diminuição nos valores.

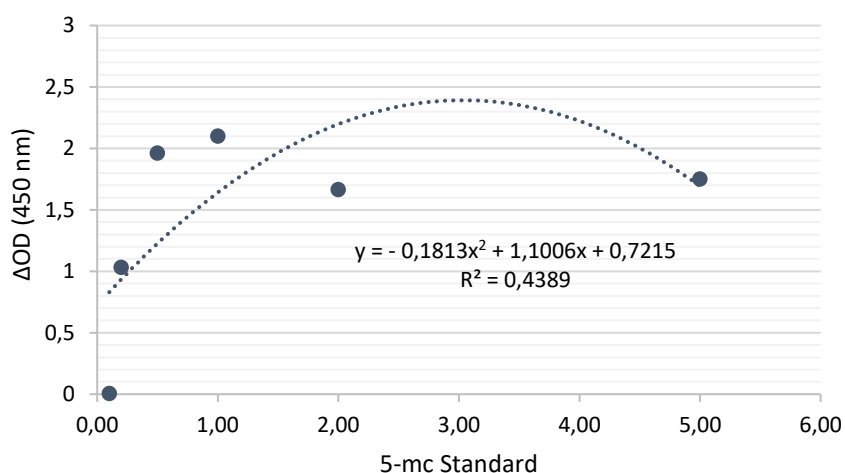


Figura 2. Curva padrão para quantificação da percentagem de 5-metilcitosina em amostras de DNA. Os pontos representam padrões conhecidos de 5-mC (0,1% a 5%), e a linha contínua ilustra o modelo de regressão quadrática ($y = -0,1813x^2 + 1,1006x + 0,7215$).

Os resultados da quantificação da metilação global de DNA em *D. magna* (Figura 3), mostram uma média de 0,430% (DP = 0,317) de 5-metilcitosina por DNA total no grupo controlo e 0,446% (DP = 0,238) no grupo exposto. No entanto, os valores de desvio padrão indicam uma elevada variabilidade dentro dos grupos. Apesar do ligeiro aumento no grupo exposto, os dados falharam no teste de normalidade (shapiro-Wilk) e o teste de Mann-Whitney não revelou diferenças significativas entre os grupos ($U = 14,000$; $p = 0,589$), sugerindo que a exposição à ciprofloxacina, na concentração testada, não alterou significativamente os níveis globais de metilação do DNA.

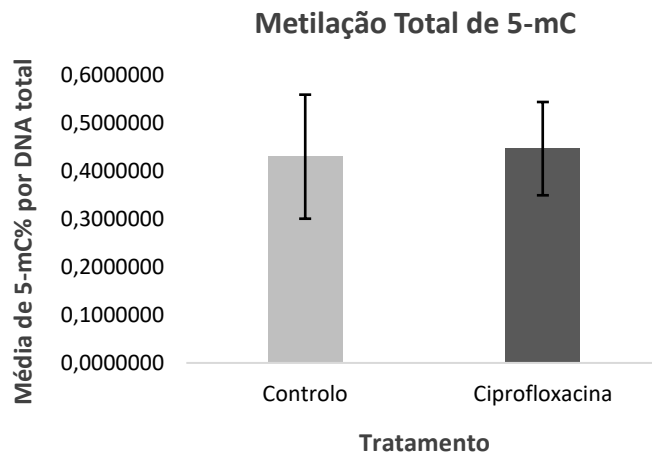


Figura 3. Níveis médios de metilação global do DNA de 5-mC% em *Daphnia magna* exposta a 19,57 mg/L de ciprofloxacina e em organismos de controlo. As barras de erro representam o erro padrão.

Foi ainda analisado o efeito que a ciprofloxacina poderia ter na taxa de alimentação das dáfrias. Desta forma, a Figura 4 mostra a taxa de alimentação de *D. magna*, expressa em número de células por hora, durante um período de 4 horas, para dois tratamentos, representados no eixo do X - grupo controlo (0 mg/L), ou seja, dáfrias não expostas à ciprofloxacina - e o grupo exposto - dáfrias expostas a 19,57 mg/L de ciprofloxacina. O grupo controlo apresentou um valor médio de taxa de alimentação de 1263028,3 células/h (DP = 718940,9) e o grupo tratado 1545076,6 células/h (DP = 829709,9). Na Figura 4, observa-se que a média da taxa de alimentação do grupo exposto é ligeiramente superior à do grupo controlo. Relativamente ao desvio padrão, os valores individuais das dáfrias dentro de cada grupo experimental variaram bastante.

O teste t efetuado resultou num valor de $p > 0,05$ ($T_7 = -0,547$; $p = 0,601$), indicando que não há diferenças significativas entre os grupos controlo e exposto, ou seja, a exposição à ciprofloxacina não afetou significativamente o comportamento alimentar das dáfrias durante o período de exposição.

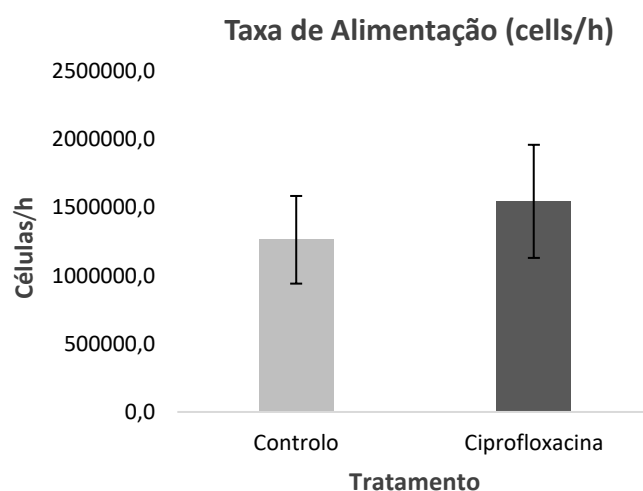


Figura 4. Taxa de Alimentação de *Daphnia magna* exposta a 19,57 mg/L e em organismos de controlo, num período de 4 h. As barras de erro representam o erro padrão.

4. Discussão

No presente estudo, avaliou-se o impacto da exposição aguda (48 horas) à ciprofloxacina (19,57 mg/L) na metilação global do DNA em *D. magna*. Os resultados mostraram que na concentração testada, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimental e controle, o que sugere a ausência de uma resposta epigenética, a nível global, face à presença do antibiótico ciprofloxacina.

Contudo, a ausência de alterações nos níveis globais de 5-metilcitosina (5-mC) não exclui a possibilidade de efeitos epigenéticos leves ou específicos em determinadas sequências genéticas críticas para a resposta ao agente de stress em causa. A ciprofloxacina pode eventualmente induzir modificações localizadas, como a metilação em promotores de genes específicos ou regiões reguladoras com elevado significado na resposta ao stress, ou ainda afetar outros mecanismos epigenéticos, como modificações de histonas e regulação por RNAs não codificantes, os quais não são detetáveis pela abordagem que foi utilizada (Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA), que apenas quantifica o conteúdo total de metilação no DNA.

O genoma de *Daphnia* é naturalmente hipometilado, apresentando níveis globais de metilação muito baixos (0,4 – 1,5%) (Asselman et al., 2015; Bultman, 2017; Kvist et al., 2018). Este cenário limita a sensibilidade de métodos globais, tornando difícil detetar pequenas alterações que possam ter relevância biológica. Segundo Bultman (2017), alterações epigenéticas relevantes podem ocorrer ao nível de genes ou de determinadas citocinas em posições específicas, sem necessariamente se refletirem numa mudança detetável nos níveis globais de 5-mC. Além disso, Bultman (2017) salienta que a metilação do DNA é altamente dependente da disponibilidade de metabolitos energéticos como S-adenosilmetionina (SAM) e α -cetoglutarato (α -KG), que funcionam como cofatores essenciais para as enzimas que apoiam a metilação e desmetilação do DNA, DNMTs e TETs. Assim, a ausência de um efeito significativo na metilação global do DNA na *D. magna* exposta à ciprofloxacina pode indicar também que, nestas condições experimentais, a ciprofloxacina não perturbou os níveis desses metabolitos essenciais para induzir uma alteração detetável na metilação global do DNA de forma ampla ou sistémica. A informação obtida através da sequenciação do transcriptoma (RNAseq) a partir das amostras de RNA produzidas neste trabalho poderá ajudar a validar algumas destas possibilidades.

Nem todos os contaminantes induzem o mesmo tipo ou magnitude de alterações na metilação do DNA. Assim como no caso da ciprofloxacina, o mecanismo de ação primário de determinados contaminantes pode não interagir diretamente com a maquinaria de metilação do DNA, ou o nível de stress induzido pode não ser suficiente para causar uma alteração na metilação global (Kvist et al., 2018). Portanto é compreensível que nem todos os contaminantes induzam um sinal global mensurável, mesmo que induzam respostas epigenéticas leves.

Paralelamente, em organismos como *Daphnia* sp., as respostas epigenéticas podem ser altamente específicas e nem sempre se manifestam como alterações globais na metilação do DNA, especialmente se o organismo possuir mecanismos eficazes para manter a homeostase metabólica e celular face ao contaminante. Desta forma, a ausência de uma alteração global detetável pode, portanto, refletir a robustez e a capacidade adaptativa de *D. magna* em gerir os efeitos do stress induzido pela ciprofloxacina.

Esta ausência de alteração significativa na metilação global do DNA pode ser interpretada como coerente com os resultados igualmente não significativos observados no ensaio de inibição da taxa de alimentação de *D. magna*. Este resultado sugere que, a exposição aguda a ciprofloxacina não comprometeu diretamente a capacidade alimentar dos organismos. No entanto, isso não exclui totalmente a possibilidade de ocorrência de efeitos posteriores ou de longo prazo que possam não ser detetáveis de imediato, mas que possam impactar a alimentação de forma indireta ao longo do tempo.

Estudos anteriores apontam para essa possibilidade. No estudo de Nunes et al. (2018), os autores descreveram alterações bioquímicas relevantes em *D. magna* expostas a ciprofloxacina, incluindo a diminuição da atividade das glutatona-S-transferases (GSTs) a uma concentração de 0,013 mg/L e a peroxidação lipídica a 0,078 mg/L, indicadores claros de stress oxidativo. Este tipo de stress pode obrigar o organismo a redirecionar energia para mecanismos de reparação (por exemplo, reparação de DNA) e defesa antioxidante. Este desvio de energia pode comprometer indiretamente funções metabólicas essenciais, como a eficiência de movimentação dos apêndices e, conseqüentemente, da alimentação.

Complementarmente, no estudo de Dionísio et al. (2020), os autores mencionam que a atividade locomotora e a ingestão de alimento são processos interligados em *D. magna* (Christensen et al., 2005). Neste estudo, após uma exposição crônica (21 dias), demonstrou-se que houve uma ligeira inibição da natação (comportamento) num período de escuridão a concentrações de 0,5 e 12,5 µg/L de ciprofloxacina em *D. magna*, o que pode estar diretamente ligado à inibição da atividade das colinesterases (ChEs) a concentrações de 0,5; 2,5 e 62,5 µg/L, que afeta a neurotransmissão e a atividade locomotora. A partir da inibição das ChEs e da relação conhecida entre a locomoção e a alimentação em *Daphnia* sp., o artigo sugere que a ciprofloxacina pode levar a uma menor eficiência alimentar.

Deste modo, ainda que não se tenha detetado uma inibição alimentar em *D. magna* estatisticamente significativa nas condições do presente estudo, a literatura evidencia mecanismos subjacentes que podem, em cenários diferentes, culminar em alterações funcionais revelantes na alimentação. Perante stress fisiológico induzido pela ciprofloxacina é plausível que *D. magna* priorize os seus recursos para a sobrevivência e desintoxicação prejudicando outros processos como a alimentação (Dionísio et al., 2020; Nunes et al., 2018; Yisa et al., 2023).

No presente estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nem na metilação global do DNA, nem na inibição da taxa de alimentação de *D. magna* após exposição aguda à ciprofloxacina. Estes resultados podem estar relacionados, em parte, com diversas limitações metodológicas e experimentais, que é importante reconhecer, e que podem, em parte, ter condicionado os resultados observados.

Uma das primeiras limitações são as propriedades físico-químicas do antibiótico utilizado no estudo (ciprofloxacina), nomeadamente a sua baixa solubilidade no meio ASTM. Como mencionado no estudo de Yu et al. (1994), a ciprofloxacina possui uma natureza zwitteriônica e a sua solubilidade é altamente dependente do pH. A solubilidade da ciprofloxacina é mínima em pHs intermédios (neutros a ligeiramente alcalinos), que coincidem com os intervalos típicos do meio ASTM (pH ~7–8). Isto pode ter resultado numa disponibilidade reduzida da substância no meio de exposição, limitando o grau de absorção pela *D. magna* e, conseqüentemente, o seu potencial impacto epigenético.

Outro fator importante relaciona-se com a duração da exposição, que neste estudo foi curta (48h). A metilação do DNA sob estímulo da exposição a ciprofloxacina pode requerer exposições prolongadas para que alterações epigenéticas mais expressivas se estabeleçam.

Relativamente à metodologia utilizada para quantificar a metilação global do DNA, foi aplicado um ensaio ELISA, cuja principal vantagem é a simplicidade, rapidez e custo reduzido. No entanto, esta abordagem apresenta limitações importantes. Este método não fornece informação locus-específica e não distingue entre diferentes contextos de citosina metilada (ex. CpG), nem permite detetar alterações epigenéticas localizadas, que podem ter elevado significado biológico mesmo quando os níveis globais de metilação permanecem inalterados. Como destacado por Asselman et al. (2015), metodologias mais resolutivas, como a sequenciação do genoma completo com bissulfito (WGBS), permitem uma análise mais detalhada e sensível das alterações epigenéticas, potencialmente revelando alterações não detetadas pela abordagem global adotada. Este tipo de análise encontra-se a ser efetuado atualmente, com as amostras de DNA produzidas neste trabalho.

Além disto, a curva padrão utilizada para estimar a percentagem de 5-metilcitosina nas amostras apresentou uma qualidade limitada. Embora a regressão quadrática obtida tenha permitido estimar a percentagem de metilação global do DNA, o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,4389$) revela uma dispersão dos dados. Este nível de variabilidade pode dever-se a instabilidades nas leituras do espectrofotómetro, erro de pipetagem, limitações da sensibilidade do ensaio ELISA. Consequentemente, esta limitação pode comprometer a precisão na quantificação da metilação global, sendo que este ensaio em particular deverá ser repetido em breve para confirmação.

Em conjunto, estas limitações apontam para a necessidade de abordagens complementares em estudos futuros.

5. Conclusão e perspectivas futuras

Neste estudo, procurou avaliar-se se a exposição à ciprofloxacina poderia provocar alterações epigenéticas em *D. magna*, especificamente ao nível da metilação global do DNA, e se essas alterações estariam associadas a efeitos fenotípicos, como a taxa de alimentação. No entanto, os resultados não mostraram diferenças significativas entre os grupos controlo e exposto, sugerindo que, nas condições testadas, a ciprofloxacina não provocou efeitos epigenéticos nem fenotípicos detetáveis.

Apesar disso, estes resultados não devem ser interpretados como definitivos para estabelecer a ausência total de efeito em *Daphnia* exposta a concentrações ambientalmente realistas de ciprofloxacina. É possível que alterações mais específicas de certos genes, tenham ocorrido sem se refletir numa alteração global de metilação. Assim, este trabalho levanta questões importantes sobre a especificidade de alguns marcadores de efeito que podem ser usados para caracterizar a complexidade das respostas epigenéticas em organismos aquáticos, apontando para a necessidade de abordagens mais detalhadas e sensíveis em estudos futuros.

Apesar de os resultados obtidos não terem sido estatisticamente significativos, os objetivos do trabalho de Pesquisa foram globalmente cumpridos, na medida em foi possível aplicar as metodologias previstas, recolher e interpretar dados relevantes, e desenvolver competências na área da epigenética e ecotoxicologia com recurso a um modelo biológico adequado.

Alguns fatores da metodologia poderão ter condicionado a deteção de alterações epigenéticas e fenotípicas. Assim, estudos futuros deverão considerar abordagens mais robustas para aprofundar o conhecimento sobre os efeitos da ciprofloxacina em organismos aquáticos como *D. magna*. Uma das melhorias que poderá ser implementada é o prolongamento do tempo de exposição. É possível que numa exposição de mais longa duração houvesse efeitos que não se manifestaram num cenário de curta duração. Outro aspeto a considerar é a otimização das condições físico-químicas do meio de exposição (ASTM), por exemplo utilização de meio com um pH ligeiramente mais ácido, desde que não comprometa o bem-estar de *D. magna*, respeitando a tolerância do organismo. Complementarmente, outra estratégia viável poderá ser a incorporação de solventes auxiliares. No estudo de Bigi et al. (2025) demonstraram que o dimetilsulfóxido (DMSO) pode atuar como um solvente eficaz para substâncias pouco solúveis e demonstra que *Daphnia* sp. é capaz de absorver tanto o DMSO como compostos lipofílicos nele dissolvidos, sugerindo que o uso controlado de DMSO poderia facilitar a dissolução e absorção da ciprofloxacina, melhorando a sua disponibilidade no meio de exposição durante ensaios ecotoxicológicos. A utilização destes solventes auxiliares pressupõe sempre o estabelecimento de um grupo controlo com o solvente para que se pudessem filtrar os efeitos do mesmo e isolar os que derivam da exposição à ciprofloxacina.

De igual modo, é fundamental recorrer a metodologias com maior sensibilidade, como a sequenciação com bissulfito (WGBS), que permitem detetar alterações epigenéticas em regiões genómicas específicas. Por fim, relativamente ao fraco ajuste da curva padrão para determinação da %5-mC seria ideal uma repetição do teste ELISA com uma maior controlo técnico e rigor experimental.

Estas melhorias experimentais poderão contribuir para uma avaliação mais completa e precisa dos efeitos da ciprofloxacina no ambiente aquático e no epigenoma em organismos modelo.

6. Bibliografia

- Anjali, R., & Shanthakumar, S. (2019). Insights on the current status of occurrence and removal of antibiotics in wastewater by advanced oxidation processes. *Journal of Environmental Management* 246, 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.05.090>
- Asselman, J., De Coninck, D. I. M., Vandegehuchte, M. B., Jansen, M., Decaestecker, E., De Meester, L., Vanden Bussche, J., Vanhaecke, L., Janssen, C. R., & De Schampelaere, K. A. C. (2015). Global cytosine methylation in *Daphnia magna* depends on genotype, environment, and their interaction. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(5), 1056–1061. <https://doi.org/10.1002/etc.2887>
- ASTM, A. (1980). Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians. *American Society for Testing and Materials*, 729, 406–430.
- Bergan, T., Dalhoff, A., & Rohwedder, R. (1988). Pharmacokinetics of Ciprofloxacin. *Infection*, 16, (Suppl. 1), S3–S13. <https://doi.org/10.1007/BF01650500>
- Bernstein, B. E., Meissner, A., & Lander, E. S. (2007). The Mammalian Epigenome. *Cell*, 128(4), 669–681. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.033>
- Bigi, S., Schlappa, K., Anselmi, S., Provenza, F., & Renzi, M. (2025). Uptake Through Feeding and/or Culture Medium of 0.5% Dimethyl Sulfoxide (DMSO): Biological Response of *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* in Ecotoxicity Tests. *Water*, 17, 191. <https://doi.org/10.3390/w17020191>
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development*, 16(1), 6–21. <https://doi.org/10.1101/gad.947102>
- Boersma, M. (1995). Competition in natural populations of *Daphnia*. *Oecologia*, 103, 309–318. <https://doi.org/10.1007/BF00328619>
- Bultman, S. J. (2017). Energy Metabolism and Epigenetics. In *Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics* (pp. 1–30). https://doi.org/10.1007/978-3-319-31143-2_87-1
- Butcher, J., Diamond, J., Berr, J., Latimer, H., Klaine, S. J., Hoang, T., & Bowersox, M. (2006). TOXICITY MODELS OF PULSED COPPER EXPOSURE TO *PIMEPHALES PROMELAS* AND *DAPHNIA MAGNA*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(9), 2541–2550. <https://doi.org/10.1897/05-630R.1>
- Cavalli, G., & Heard, E. (2019). Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease. *Nature*, 571(7766), 489–499. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1411-0>
- Chin, N.-X., & Neu, H. C. (1984). Ciprofloxacin, a Quinolone Carboxylic Acid Compound Active Against Aerobic and Anaerobic Bacteria. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 25(3), 319–326. <https://doi.org/10.1128/aac.25.3.319>
- Christensen, B. T., Lauridsen, T. L., Ravn, H. W., & Bayley, M. (2005). A comparison of feeding efficiency and swimming ability of *Daphnia magna* exposed to cypermethrin. *Aquatic Toxicology*, 73(2), 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.03.011>
- Dalla Bona, M., Di Leva, V., & De Liguoro, M. (2014). The sensitivity of *Daphnia magna* and *Daphnia curvirostris* to 10 veterinary antibacterials and to some of their binary mixtures. *Chemosphere*, 115(1), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.003>

- Dalla Bona, M., Zounková, R., Merlanti, R., Blaha, L., & De Liguoro, M. (2015). Effects of enrofloxacin, ciprofloxacin, and trimethoprim on two generations of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.11.018>
- Deans, C., & Maggert, K. A. (2015). What do you mean, “Epigenetic”? *Genetics*, 199(4), 887–896. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173492>
- Denissenko, M. F., Chen, J. X., Tang, M.-S., & Pfeifer, G. P. (1997). Cytosine methylation determines hot spots of DNA damage in the human P53 gene (benzo[a]pyrene5-methylcytosine). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(8), 3893–3898. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.8.3893>
- Dionísio, R., Daniel, D., Alkimin, G. D. de, & Nunes, B. (2020). Multi-parametric analysis of ciprofloxacin toxicity at ecologically relevant levels: Short- and long-term effects on *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 74. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103295>
- Drlica, K., & Zhao, X. (1997). DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, 61(3), 377–392. <https://doi.org/10.1128/mmb.61.3.377-392.1997>
- Duarte, A. C., Rodrigues, S., Afonso, A., Nogueira, A., & Coutinho, P. (2022). Antibiotic Resistance in the Drinking Water: Old and New Strategies to Remove Antibiotics, Resistant Bacteria, and Resistance Genes. *Pharmaceuticals*, 15(4), 393. <https://doi.org/10.3390/ph15040393>
- Ebert D. (2005). Ecology, epidemiology and evolution of parasitism in *Daphnia*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>
- Ebert, D. (2022). *Daphnia* as a versatile model system in ecology and evolution. *EvoDevo*, 13(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s13227-022-00199-0>
- Eliopoulos, G. M., Gardella, A., & Moellering, R. C. (1984). In Vitro Activity of Ciprofloxacin, a New Carboxyquinoline Antimicrobial Agent. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 25(3), 331–335. <https://doi.org/10.1128/aac.25.3.331>
- Fent, K., Weston, A. A., & Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76(2), 122–159. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.009>
- Galimov, Y., Walser, B., & Haag, C. R. (2011). Frequency and inheritance of non-male producing clones in *Daphnia magna*: Evolution towards sex specialization in a cyclical parthenogen? *Journal of Evolutionary Biology*, 24(7), 1572–1583. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02288.x>
- Gaudino, E., Canova, E., Liu, P., Wu, Z., & Cravotto, G. (2021). Degradation of antibiotics in wastewater: New advances in cavitation treatments. *Molecules*, 26(3), 617. <https://doi.org/10.3390/molecules26030617>
- Ghosh, S., Pourebrahimi, S., Malloum, A., Ajala, O. J., AlKafaas, S. S., Onyeaka, H., Nnaji, N. D., Oroke, A., Bornman, C., Christian, O., Ahmadi, S., & Wani, M. Y. (2023). A review on ciprofloxacin removal from wastewater as a pharmaceutical contaminant: Covering adsorption to advanced oxidation processes to computational studies. *Materials Today Communications*, 37(107500). <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2023.107500>
- Goldberg, A. D., Allis, C. D., & Bernstein, E. (2007). Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell*, 128(4), 635–638. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.006>

- Gyllström, M., & Hansson, L. A. (2004). Dormancy in freshwater zooplankton: Induction, termination and the importance of benthic-pelagic coupling. *Aquatic Sciences*, 66(3), 274–295. <https://doi.org/10.1007/s00027-004-0712-y>
- Harris, K. D. M., Bartlett, N. J., & Lloyd, V. K. (2012). *Daphnia* as an Emerging Epigenetic Model Organism. *Genetics Research International*, 2012(147892), 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/147892>
- Hearn, J., Plenderleith, F., & Little, T. J. (2021). DNA methylation differs extensively between strains of the same geographical origin and changes with age in *Daphnia magna*. *Epigenetics and Chromatin*, 14(4), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13072-020-00379-z>
- Hebert PDN (1987). Genetics of *Daphnia*. *Memorie dell' Istituto Italiano di Idrobiologia*, 45, 439–460
- Idrees, M., Haq Khan, Z. U., Sabahat, S., Sun, J., Shah, N. S., & Iqbal, J. (2025). Advancements in photocatalytic systems for ciprofloxacin degradation, efficiency, mechanisms, and environmental considerations. *Journal of Molecular Liquids*, 424(127115). <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2025.127115>
- Ito, S., Dalessio, A. C., Taranova, O. V., Hong, K., Sowers, L. C., & Zhang, Y. (2010). Role of tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 466(7310), 1129–1133. <https://doi.org/10.1038/nature09303>
- Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 33, 245–254. <https://doi.org/10.1038/ng1089>
- Jeremias, G., Barbosa, J., Marques, S. M., Asselman, J., Gonçalves, F. J. M., & Pereira, J. L. (2018). Synthesizing the role of epigenetics in the response and adaptation of species to climate change in freshwater ecosystems. *Molecular Ecology*, 27(13), 2790–2806. <https://doi.org/10.1111/mec.14727>
- Jeremias, G., Gonçalves, F. J. M., Pereira, J. L., & Asselman, J. (2020). Prospects for incorporation of epigenetic biomarkers in human health and environmental risk assessment of chemicals. *Biological Reviews*, 95(3), 822–846. <https://doi.org/10.1111/brv.12589>
- Kleiven, O. T., Larsson, P., & Hobaek, A. (1992). Sexual Reproduction in *Daphnia magna* Requires Three Stimuli. *Oikos*, 65(2), 197–206. <https://doi.org/10.2307/3545010>
- Korpelainen, H. (1986). The effects of temperature and photoperiod on life history parameters of *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera). *Freshwater Biology*, 16, 615–620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1986.tb01004.x>
- Kumar, M., Sridharan, S., Sawarkar, A. D., Shakeel, A., Anerao, P., Mannina, G., Sharma, P., & Pandey, A. (2023). Current research trends on emerging contaminants pharmaceutical and personal care products (PPCPs): A comprehensive review. *Science of the Total Environment*, 859. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160031>
- Kümmerer, K. (2003). Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), 5–7. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg293>
- Kvist, J., Gonçalves Athanásio, C., Shams Solari, O., Brown, J. B., Colbourne, J. K., Pfrender, M. E., & Mirbahai, L. (2018). Pattern of DNA Methylation in *Daphnia*: Evolutionary Perspective. *Genome Biology and Evolution*, 10(8), 1988–2007. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy155>

- Lindeman, L. C., Thaulow, J., Song, Y., Kamstra, J. H., Xie, L., Asselman, J., Aleström, P., & Tollefsen, K. E. (2019). Epigenetic, transcriptional and phenotypic responses in two generations of *Daphnia magna* exposed to the DNA methylation inhibitor 5-azacytidine. *Environmental Epigenetics*, 5(3). <https://doi.org/10.1093/eep/dvz016>
- Liu, L., Wu, W., Zhang, J., Lv, P., Xu, L., & Yan, Y. (2018). Progress of research on the toxicology of antibiotic pollution in aquatic organisms. *Acta Ecologica Sinica*, 38(1), 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.01.006>
- Liu, R., Morselli, M., Yampolsky, L. Y., Peshkin, L., & Pellegrini, M. (2025). Genome-wide DNA methylation patterns in *Daphnia magna* are not significantly associated with age. *Epigenetics and Chromatin*, 18(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s13072-025-00580-y>
- Lyko, F. (2018). The DNA methyltransferase family: A versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature Reviews Genetics*, 19(2), 81–92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.80>
- Lynch, M., & Gabriel, W. (1983). Phenotypic evolution and parthenogenesis. *The American Naturalist*, 122(6), 745–764. <https://doi.org/10.1086/284169>
- Maghsodian, Z., Sanati, A. M., Mashifana, T., Sillanpää, M., Feng, S., Nhat, T., & Ramavandi, B. (2022). Occurrence and Distribution of Antibiotics in the Water, Sediment, and Biota of Freshwater and Marine Environments: A Review. *Antibiotics*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111461>
- Martins, N., Pereira, R., Abrantes, N., Pereira, J., Gonçalves, F., & Marques, C. R. (2012). Ecotoxicological effects of ciprofloxacin on freshwater species: Data integration and derivation of toxicity thresholds for risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4), 1167–1176. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0871-x>
- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23–38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
- Nguyen, N. D., Matsuura, T., Kato, Y., & Watanabe, H. (2021). DNMT3.1 controls trade-offs between growth, reproduction, and life span under starved conditions in *Daphnia magna*. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86578-4>
- Nunes, B., Leal, C., Rodrigues, S., & Antunes, S. C. (2018). Assessment of ecotoxicological effects of ciprofloxacin in *Daphnia magna*: Life-history traits, biochemical and genotoxic effects. *Water Science and Technology*, (3), 835–844. <https://doi.org/10.2166/WST.2018.255>
- OECD (1998). *Daphnia magna* reproduction test – Test guide line 211. Organization for the Economic Cooperation and Development. Paris.
- OECD (2004). OECD guide line for testing of chemicals 202 – *Daphnia sp.*, acute immobilization test. Organization for the Economic Cooperation and Development. Paris.
- Oharisi, O. oke L., Ncube, S., Nyoni, H., Madikizela, M. L., Olowoyo, O. J., & Maseko, B. R. (2023). Occurrence and prevalence of antibiotics in wastewater treatment plants and effluent receiving rivers in South Africa using UHPLC-MS determination. *Journal of Environmental Management*, 345. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.118621>
- Park, H.-R., Kim, H., & Bark, K.-M. (2002). Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 37(6), 443–460. [https://doi.org/10.1016/S0223-5234\(02\)01361-2](https://doi.org/10.1016/S0223-5234(02)01361-2)

- Pauletto, M., & De Liguoro, M. (2024). A Review on Fluoroquinolones' Toxicity to Freshwater Organisms and a Risk Assessment. *Journal of Xenobiotics*, 14(2), 717–752. <https://doi.org/10.3390/jox14020042>
- Pena, A., Paulo, M., Silva, L. J. G., Seifrtová, M., Lino, C. M., & Solich, P. (2010). Tetracycline antibiotics in hospital and municipal wastewaters: A pilot study in Portugal. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(8), 2929–2936. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3581-3>
- Poloczanska, E. S., Brown, C. J., Sydeman, W. J., Kiessling, W., Schoeman, D. S., Moore, P. J., Brander, K., Bruno, J. F., Buckley, L. B., Burrows, M. T., Duarte, C. M., Halpern, B. S., Holding, J., Kappel, C. V., O'Connor, M. I., Pandolfi, J. M., Parmesan, C., Schwing, F., Thompson, S. A., & Richardson, A. J. (2013). Global imprint of climate change on marine life. *Nature Climate Change*, 3(10), 919–925. <https://doi.org/10.1038/nclimate1958>
- Rodriguez-Mozaz, S., Vaz-Moreira, I., Varela Della Giustina, S., Llorca, M., Barceló, D., Schubert, S., Berendonk, T. U., Michael-Kordatou, I., Fatta-Kassinos, D., Martinez, J. L., Elpers, C., Henriques, I., Jaeger, T., Schwartz, T., Paulshus, E., O'Sullivan, K., Pärnänen, K. M. M., Virta, M., Do, T. T., Walsh, F., Manaia, C. M. (2020). Antibiotic residues in final effluents of European wastewater treatment plants and their impact on the aquatic environment. *Environment International*, 140. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105733>
- Santos, L. H. M. L. M., Araújo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., & Montenegro, M. C. B. S. M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 175, 45–95. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.100>
- Seifrtová, M., Pena, A., Lino, C. M., & Solich, P. (2008). Determination of fluoroquinolone antibiotics in hospital and municipal wastewaters in Coimbra by liquid chromatography with a monolithic column and fluorescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(3), 799–805. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2020-1>
- Silvestre, F., Gillardin, V., & Dorts, J. (2012). Proteomics to assess the role of phenotypic plasticity in aquatic organisms exposed to pollution and global warming. *Integrative and Comparative Biology*, 52(5), 681–694. <https://doi.org/10.1093/icb/ics087>
- Stibor, H., & Lampert, W. (2000). Components of additive variance in life-history traits of *Daphnia hyalina*: seasonal differences in the response to predator signals. *Oikos*, 88(1), 129–138. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2000.880115.x>
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L., & Rao, A. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*, 324(5929), 930–935. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>
- Taylor, D. J., Crease, T. J., & Brown, W. M. (1999). Phylogenetic evidence for a single long-lived clade of crustacean cyclic parthenogens and its implications for the evolution of sex. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 266(1421), 791–797. <https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0707>
- Threlkeld ST (1987). *Daphnia* life history strategies and resource allocation patterns. *Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia*, 45, 353–366.

- Turnidge, J. (1999). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Fluoroquinolones. *Drugs*, 58, 29-36. <https://doi.org/10.2165/00003495-199958002-00006>
- Vandeghechuchte, M. B., Lemière, F., Vanhaecke, L., Vanden Berghe, W., & Janssen, C. R. (2010). Direct and transgenerational impact on *Daphnia magna* of chemicals with a known effect on DNA methylation. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 151(3), 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.11.007>
- Viana, P., Meisel, L., Lopes, A., De Jesus, R., Sarmento, G., Duarte, S., Sepodes, B., Fernandes, A., Dos Santos, M. M. C., Almeida, A., & Oliveira, M. C. (2021). Identification of antibiotics in surface-groundwater. A tool towards the ecopharmacovigilance approach: A portuguese case-study. *Antibiotics*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080888>
- Yampolsky L. Yu. (1992). Genetic Variation in the Sexual Reproduction Rate within a Population of a Cyclic Parthenogen, *Daphnia magna*. *Evolution*, 46(3), 833–837. <https://doi.org/doi.org/10.2307/2409651>
- Yisa, A. G., Chia, M. A., Gadzama, I. M. K., Oniye, S. J., Sha'aba, R. I., & Gauje, B. (2023). Immobilization, oxidative stress and antioxidant response of *Daphnia magna* to Amoxicillin and Ciprofloxacin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 98. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2023.104078>
- Yu Xuanqiang, Zipp Gail L., & Davidson III, G. R. (1993). The Effect of Temperature and pH on the Solubility of Quinolone Compounds: Estimation of Heat of Fusion. *Pharmaceutical Research*, 11, 522–527. <https://doi.org/doi.org/10.1023/A:1018910431216>
- Zaffagnini F (1987). Reproduction in *Daphnia*. *Memorie dell' Istituto Italiano di Idrobiologia*, 45, 245–284.
- Zeiler, H.-J., & Grohe, K. (1984). The In Vitro and In Vivo Activity of Ciprofloxacin. *European Journal of Clinical Microbiology*, 3, 339–343. <https://doi.org/10.1007/BF01977490>