

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Luis Antonio Baldissarelli

Efeitos do arsênio sobre as atividades ectonucleotidásicas e parâmetros
comportamentais em peixe zebra (*Danio rerio*)

Porto Alegre
Março, 2010

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Efeitos do arsênio sobre as atividades ectonucleotídicas e parâmetros
comportamentais em peixe zebra (*Danio rerio*)

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular como requisito para a obtenção do grau de mestre.

Autor
Luís Antônio Baldissarelli

Orientadora
Prof. Dra. Carla Denise Bonan

Porto Alegre
Março, 2010

AGRADECIMENTOS

A minha mãe que sempre me apoiou e me conduziu da melhor forma possível, se transformando no pilar principal para que todo o trabalho tivesse êxito, obrigado por tudo.

A minha namorada Adriana, que me incentivou do início até o fim do mestrado, muito obrigado por tudo, você é responsável pela minha persistência.

A minha orientadora Carla Denise Bonan, por toda a orientação concebida e pela confiança em mim dedicada, agradeço a dedicação pessoal na qual me orientou muito obrigado por tudo, sem palavras para agradecer.

A bolsista Katiucia Marques Capiotti por todo o empenho e dedicação no decorrer do trabalho, muito obrigado você foi fundamental para o sucesso do trabalho.

Agradeço também a Gabriele Ghisleni por toda a orientação e auxílio no decorrer do trabalho.

A todos os colegas do laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia por todos os momentos de distração, pelos auxílios prestados e pelas amizades.

Agradeço a todas as pessoas que de forma direta ou indiretamente me auxiliaram neste trabalho.

RESUMO

O peixe zebra é um pequeno teleósteo que vem sendo considerado um modelo ideal para estudos de numerosas doenças humanas. Estudos demonstraram que muitos genes deste peixe são similares ao de mamíferos, inclusive humanos. Evidências têm indicado o importante papel desempenhado pelo ATP e a adenosina no sistema nervoso central (SNC). O neurotransmissor ATP é armazenado de forma vesicular e liberado na fenda sináptica, onde pode agir em receptores específicos localizados na membrana celular. A inativação do sinal mediado pelo ATP extracelular é realizada por uma família de enzimas denominadas ectonucleotidases, incluindo as NTPDases (nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases) e a ecto-5'-nucleotidase. Estas enzimas são responsáveis pelo catabolismo extracelular do neurotransmissor ATP até adenosina. Estudos do nosso laboratório demonstraram a presença de ectonucleotidases como as NTPDases e a ecto-5'-nucleotidase no SNC de zebrafish. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito *in vivo* da exposição subcrônica (96 horas) ao arsênio sobre a atividade das NTPDases e ecto-5'-nucleotidase em cérebro de peixe zebra, além de avaliar as alterações comportamentais induzidas pelo arsênio nesta espécie. Quanto aos parâmetros comportamentais, houve uma diminuição na atividade locomotora de animais submetidos a 5 mg/L de arsênio (30,5%) quando comparado com o grupo controle, sendo que não houve alteração na distância percorrida durante 5 minutos de análise. Durante 5 minutos de avaliação comportamental, não foram observadas alterações na velocidade média e no ângulo do nado dos peixes em todas as concentrações testadas de arsênio (0,05 mg/L, 5 mg/L e 15 mg/L). O tempo gasto no terço superior do tanque não foi alterado entre os grupos testados com diferentes concentrações de arsênio. O tempo gasto na zona média do tanque diminuiu significativamente nas concentrações de 0,05 mg/L (55%), 5 mg/L (62%) e 15 mg/L (62%) quando comparado ao grupo controle. Além disso, o tempo gasto na zona inferior foi significativamente maior (28%) apenas no grupo tratado com 5 mg/L arsênio quando comparado ao controle. Houve uma diminuição significativa na hidrólise de ATP na presença de 0,05 mg/L (37,6%), 5 mg/L (34,8%) e 15 mg/L (30,6%) de arsênio quando comparado ao controle. O efeito inibitório também foi observado sobre a hidrólise do ADP nas concentrações de 0,05 mg/L (25%), 5 mg/L (38%) e 15 mg/L (41%) quando comparado ao controle. Com relação a atividade da 5'-nucleotidase, uma redução na hidrólise do AMP foi promovida pelo arsênio nas concentrações de 50 mg/L (37,7%), 5 mg/L (26,7%) e 15 mg/L (35%). Os resultados demonstraram que as alterações sobre ectonucleotidases após tratamentos com arsênio podem ser um dos fatores envolvidos nos efeitos neurotóxicos e comportamentais induzidos por este contaminante no sistema nervoso central.

Palavras chaves: arsênio, ectonucleotidases, peixe zebra, nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase, ecto-5'-nucleotidase, atividade locomotora.

ABSTRACT

The zebrafish is a small teleost that has been considered an ideal model for studying many human diseases. Studies have shown that many genes are similar to mammals', including humans. Evidence has indicated the important role played by ATP and adenosine in the central nervous system (CNS). The neurotransmitter ATP is stored in a vesicular manner and released into the synaptic cleft, where it can act on specific receptors located in the cell membrane. The inactivation of the signal mediated by extracellular ATP is performed by a family of enzymes called ectonucleotidases, including NTPDases (nucleoside triphosphate diphosphohydrolases) and ecto-5'-nucleotidase. These enzymes are responsible for the extracellular catabolism of the neurotransmitter ATP to adenosine. Studies from our laboratory showed the presence of ectonucleotidases, such as NTPDases and ecto-5'-nucleotidase in the CNS of zebrafish. The objective of this study was to investigate the in vivo effects of subchronic exposure (96 hours) to arsenic on NTPDases and ecto-5'-nucleotidase activities in zebrafish brain and to evaluate the behavioral changes induced by arsenic in this species. For the behavioral parameters, there was a decrease in locomotor activity of animals exposed to 5 mg/L arsenic (30.5%) when compared with the control group whereas there were no changes in the distance traveled during 5 minutes of analysis. During 5 minutes of behavioral assessment, no significant changes were observed in mean speed and in absolute turn for all arsenic concentrations tested. The time spent in the upper tank was not changed between the groups tested with different arsenic concentrations. The time spent in the middle of the tank significantly decreased at 0.05 mg/L (55%), 5 mg/L (62%) and 15 mg/L (62%) when compared to control group. Moreover, the time spent in the lower region is significantly higher (28%) only in the group treated with 5 mg/L arsenic when compared to control. There was a significant decrease in ATP hydrolysis in the presence of 0.05 mg/L (37.6%), 5 mg/L (34.8%), and 15 mg/L (30.6%) arsenic when compared to control. The inhibitory effect was also observed in ADP hydrolysis at 0.05 mg/L (25%), 5 mg/L (38%) and 15 mg/L (41%) when compared to control. Regarding to 5'-nucleotidase activity, a reduction in AMP was promoted by arsenic 0.05 mg/L (37.7%), 5 mg/L (26.7%), and 15 mg/L (35%). The results demonstrated that changes on ectonucleotidases after arsenic treatments can be one of the factors involved in behavioral and neurotoxic effects induced by this contaminant in the central nervous system.

Keywords: arsenic, ectonucleotidases, zebrafish, nucleoside triphosphate diphosphohydrolase, locomotor activity.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP - adenosina 5' - difosfato

AMP - adenosina 5' - monofosfato

AMPC- adenosina 5' - monofosfato cíclico

As(III) - arsenito

As(V) - arseniato

AsB - arsenobetaína

ATP - adenosina 5' - trifosfato

ATSDR / EPA – Agência para registro de doenças e substâncias tóxicas/ agência de proteção ambiental (do inglês *Agency for Toxic Substances and Disease Registry / Environmental Protection Agency*)

DMA - íon dimetilarsínico

DMAA - ácido dimetilarsínico

GABA - ácido γ -amino butírico

K⁺ - potássio

K_M - constante de Michaelis

Mg⁺² - magnésio

MMA - íon monometilarsônico

mRNA – RNA mensageiro

Na⁺ - sódio

NTPDase - nucleosídeo trifosfato difosfoidrolase

SNC - sistema nervoso central

SNP – sistema nervoso periférico

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Peixe Zebra (Danio rerio)</i>	16
<i>Figura 2: Modelo esquemático de uma sinapse purinérgica</i>	25

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	9
1. INTRODUÇÃO	10
1.1. <i>Problemática ambiental</i>	10
1.2. <i>Arsênio</i>	11
1.3. <i>Peixe Zebra (Danio rerio)</i>	15
1.4. <i>Sistema Purinérgico</i>	21
1.4.1 <i>Ectonucleotidases</i>	24
2. OBJETIVOS	28
2.1. <i>Objetivo geral</i>	28
2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	28
CAPÍTULO 2 - Arsenic alters ectonucleotidase activities and behavioral parameters in zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	29
<i>Abstract</i>	31
<i>INTRODUCTION</i>	32
2 <i>MATERIAL AND METHODS</i>	34
2.1 <i>Experimental animals</i>	34
2.2 <i>In vivo treatment</i>	34
2.3 <i>Behavioral parameters</i>	35
2.4 <i>Preparation of Brain Membranes of Zebrafish</i>	35
2.5 <i>Enzyme assays</i>	36
2.6 <i>Protein Determination</i>	36
2.7 <i>Statistical Analysis</i>	37
3. <i>RESULTS</i>	37
<i>DISCUSSION</i>	38
<i>Acknowledgments</i>	42
<i>REFERENCES</i>	43
<i>LEGEND OF FIGURES</i>	50
CAPÍTULO 3 – <i>CONSIDERAÇÕES FINAIS</i>	53
<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	59
<i>ANEXO</i>	72

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Problemática ambiental

Teoricamente a população humana na terra continuará a aumentar o que poderá acarretar conseqüências danosas para o meio ambiente. A população humana atual está consumindo os recursos mais rapidamente do que eles são regenerados pela biosfera e, ao mesmo tempo, produzindo dejetos em proporções que ameaçam a qualidade do meio ambiente (RICKLEFS, 1996). A poluição ambiental causada por resíduos de metais pesados é muito relevante pelo seu amplo uso em processos industriais e agrícolas, sendo que muitos efluentes chegam ao meio ambiente sem qualquer tratamento (KUNO et al., 1999; SCHERER et al., 2003). A contaminação dos alimentos, água e ar com estes poluentes tornaram-se iminentes e, conseqüentemente, efeitos adversos são inevitáveis em humanos, plantas e animais, onde um dos grupos mais atingidos são os peixes (MACHADO et al. 2002). Vários ecossistemas importantes estão localizados no ambiente aquático, que ocupa cerca de 70% da superfície global. O desenvolvimento tecnológico tem causado um crescente conflito porque, enquanto a água representa a fonte vital para a vida, é também um veículo para o transporte e diluição de diversos compostos tóxicos (SCHNURSTEIN & BRAUNBECK, 2001). Neste contexto, diversas estratégias têm sido adotadas para analisar o potencial risco de poluição aquática para a saúde humana ou para a fauna que habita estes corpos aquáticos. Níveis seguros de diversos poluentes têm sido estabelecidos em diferentes países, representando a máxima concentração de uma determinada espécie química, que é

considerada não-tóxica para humanos e/ou outras fontes de vida (SCHNURSTEIN & BRAUNBECK, 2001).

1.2. Arsênio

O arsênio existe na natureza numa variedade de formas químicas, incluindo espécies orgânicas e inorgânicas, como resultado de sua participação em complexos biológicos, processos químicos e algumas aplicações industriais, como na manufatura de vidros, materiais semicondutores e fotocondutores, entre outros (STUMMEYER et al, 1996). O arsênio também pode ser obtido como subproduto da fundição e queima de combustíveis fósseis e produção de pesticidas acumulando-se no solo e sendo absorvido por grãos vegetais e organismos marinhos (KUROSAWA et al., 2008; SMITH et al., 2008).

Os altos níveis de toxicidade do arsênio são muito bem conhecidos, pois compostos de arsênio são facilmente absorvidos, tanto oralmente quanto por inalação, sendo a extensão da absorção dependente da solubilidade do composto (DEMESMAY et al, 1994).

Uma longa exposição a compostos inorgânicos de arsênio, através da água de beber, pode conduzir a várias doenças tais como: conjuntivite, hiperqueratose, hiperpigmentação, doenças cardiovasculares, distúrbios no sistema nervoso central e vascular periférico, câncer de pele e gangrena nos membros (CHEN E WANG, 1990; EPA, 1984; YU, 1999). O efeito tóxico das espécies de arsênio depende, principalmente, de sua forma química. O arsênio em águas naturais pode ocorrer como As(III) (arsenito), As(V) (arseniato), íon monometilarsênico (MMA) e íon dimetilarsênico (DMA). Águas subterrâneas contêm arsênio como arsenito e arseniato. Em águas de mar, lagoas, lagos, e onde houver possibilidade de biometilação, arsenito e arseniato ocorrem junto com MMA e DMA (ANDERSON et

al, 1986). A ordem decrescente de toxicidade dos compostos de arsênio, segundo ANDERSON et al. (1986) é a seguinte: arsina > arsenito > arseniato > ácidos alquilarsênicos > compostos de arsênio > arsênio elementar. O arsênio trivalente (arsenito) é 60 vezes mais tóxico do que a forma oxidada pentavalente (arseniato). Os compostos inorgânicos são 100 vezes mais tóxicos do que as formas parcialmente metiladas (MMA e DMA) (CHATTERJEE et al, 2000).

Arsênio (III) e As (V) são as espécies mais tóxicas, enquanto arsenobetaína e arsenocolina são relativamente não tóxicas. A LD₅₀ (a dose letal para 50% de uma população) para As₂O₃ (trióxido de arsênio) em ratos é de 20 mg.kg⁻¹, para KAsO₂ (arsenito de potássio) é de 14 mg.kg⁻¹, para Ca₃(AsO₄)₂ (arseniato de cálcio) é de 20 mg.kg⁻¹, para MMAA (ácido monometilarsênico) é de 700-800 mg.kg⁻¹, para DMAA (ácido dimetilarsênico) é de 700-2600 mg.kg⁻¹, enquanto que para arsenobetaína e para arsenocolina não foi observado sinal de toxicidade em camundongos após dose oral de 10 g.kg⁻¹ e de 6,5 g.kg⁻¹, respectivamente (PETROPULU et al, 1997). O fígado é um dos principais órgãos-alvo da toxicidade do arsênio em camundongos (WAALKES et al 2003, XIE et al, 2004) e de seres humanos (CHEN et al, 1986, CHEN et al, 1992, MAZUMDER et al, 1998, LU et al, 2001, TCHOUNWOU et al, 2003). As lesões hepáticas induzidas por arsênio em seres humanos são um fenômeno comum, normalmente manifestado inicialmente por lesões degenerativas como icterícia, progredindo para fibrose, cirrose e a neoplasia como carcinoma hepatocelular (LU et al, 2001, MAZUMDER et al, 1998, CENTENO et al, 2002). O arsênio pode causar efeitos no desenvolvimento embrionário de ratos, incluindo a diminuição do peso e alterações no desenvolvimento do cérebro fetal e comportamento pós-natal (HILL et al., 2008; HOLSON et al., 2000; NEMEC et al., 1998; RODRIGUEZ et al., 2002; TABOCOVA et al., 1996). O Arsênio também pode afetar a vasculogênese placentária, aumentar

a taxa de abortos espontâneos (ANDREW et al. 2006, HE et al. 2007), causar modificações epigenéticas (XIE et al. 2007) e induzir defeitos do tubo neural ratos expostos a toxicidade de arsênio (HILL et al. 2008).

O arsênio inorgânico sofre metilações no corpo humano que consiste em um processo de desintoxicação que ocorre nos rins e reduz a afinidade do composto para com o tecido. As etapas de metilação são: As(V) - As(III) - MMA(V) - MMA(III) - DMA(V). Logo, quando o arsênio inorgânico é ingerido, os metabólitos do arsênio inorgânico, DMA e MMA, são eliminados através da urina (a principal via de eliminação) (BLAS et al, 1994).

O arsênio inorgânico possui formas pentavalentes que competem em reações enzimáticas com os grupos fosfato, durante o processo de fosforilação oxidativa. Uma das reações afetadas é catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase que, ao interagir com o arsênio, origina um arseniato lábil que bloqueia a síntese de ATP, fenômeno denominado de arsenólise. Atua também na respiração celular alterando o metabolismo de NAD e NADH. Com a redução dos níveis de NADH, ocorre um déficit na produção celular de ATP e um aumento na produção de peróxido de hidrogênio, que pode causar estresse oxidativo e produção de espécies reativas de oxigênio (KLAASSEN, 2001).

Formas trivalentes do arsênio apresentam uma grande afinidade com o grupo sulfidril de proteínas e enzimas, causando a inibição de uma grande variedade de processos oxidativos intracelulares. Outro alvo é o ácido lipóico, cuja ligação com o arsênio provoca distúrbios metabólicos, já que várias enzimas oxidativas, que necessitam desta coenzima são inibidas, tais como o complexo da piruvato desidrogenase e da alfa-cetoglutarato desidrogenase (RAMANATHAN et al., 2003). Esta forma trivalente também reduz a atividade da glutatona redutase, levando a uma diminuição de GSH, que juntamente com o estresse oxidativo e as espécies

reativas de oxigênio podem desencadear processos carcinogênicos. Os compostos inorgânicos de arsênio ainda podem alterar as vias de sinalização celulares e causar danos na expressão dos genes (KLAASSEN, 2001).

A química ambiental do arsênio é complexa, em virtude das grandes diferenças entre as propriedades dos seus compostos de origem natural ou antropogênica. Dentre as reações químicas envolvendo o arsênio no meio ambiente, destaca-se a metilação. Mesmo que compostos metilados de arsênio não sejam usados na agricultura, o arsênio inorgânico pode ser convertido em formas metiladas no meio ambiente, que são liberadas no meio aquoso, tornando-se disponíveis para aumentar os níveis de arsênio na cadeia alimentar. Como a biodisponibilidade e os efeitos fisiológicos/toxicológicos do arsênio dependem de sua forma química, o conhecimento da especiação e transformação no meio ambiente torna-se muito importante, necessitando de métodos adequados para a separação e determinação das espécies de arsênio. Compostos arseno-orgânicos, presentes em sistemas biológicos, são muito menos tóxicos. A flora e fauna marinhas contêm um número de compostos de arsênio onde este elemento parece ser trocado por nitrogênio ou fósforo nas vias metabólicas. Tais compostos incluem, além da arsenobetaína, a arsenocolina e arseno-açúcares de origem algal (HOWARD et al, 1993). Organismos marinhos acumulam quantidades substanciais de arsênio de modo mais eficiente que os organismos terrestres. Algas marinhas absorvem arseniatos (forma predominante de arsênio na água do mar), e o transformam em diferentes ribosídeos contendo arsênio. O arseniato é absorvido devido a sua similaridade com o fosfato, que é essencial. Os organismos marinhos adquirem arsênio através da cadeia alimentar, e transformam o arsênio inorgânico em arsenobetaína via MMA e DMA, através da metilação (NICE et al, 2008).

A arsenobetaína, cuja presença em alimentos de origem marinha constitui a maior fonte de arsênio na dieta, é essencialmente não tóxica e excretada na urina, sem modificação, com tempo de permanência no organismo muito curto (de 6 a 24 horas, no máximo). Quando o ser humano sofre uma exposição a arsênio, aguda ou crônica, sua concentração é freqüentemente monitorada pela determinação de arsênio total na urina. Por exemplo, arsênio inorgânico ingerido (por inalação, comida ou bebida) como As(V) é reduzido a As(III), o qual está sujeito às etapas do processo de metilação – inicialmente a MMA, e em seguida a DMA. Se o arsênio é ingerido nas formas menos tóxicas, MMA ou DMA, ou formas não tóxicas derivadas da arsenobetaína e arsenocolina, nenhum processo de metilação ou desmetilação parece ocorrer, e essas formas são excretadas na urina sem mudança na estrutura (HANNA et al, 1993).

O arsênio foi classificado como a principal e mais potente substância perigosa, em 2005, de acordo com o ATSDR / EPA. A legislação ambiental brasileira estabeleceu valores de até 50 µg/l para o arsênio (As) como sendo seguro (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, resolução 20, 30/07/1996; www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html).

1.3. Peixe Zebra (*Danio rerio*)

O peixe zebra (*Danio rerio*), também conhecido por *zebrafish* ou “paulistinha” pelos aquarofilistas, é um pequeno teleósteo da família Cyprinidae. O pioneiro a estudar esta espécie foi George Streisinger, o qual, no final da década de 60, utilizou técnicas de análise mutacional para avaliar o desenvolvimento embrionário do *zebrafish* (STREISINGER et al., 1981).



Fig.1: Peixe zebra (*Danio rerio*)

A descrição inicial do uso do peixe zebra em estudos científicos envolvendo biologia do desenvolvimento possibilitou um grande avanço no conhecimento da embriogênese e do ciclo de vida dos vertebrados. Isto se deve a diversas vantagens que este animal apresenta, tais como a presença de ovos translúcidos, a grande prole e o curto ciclo de desenvolvimento, cuja fase do ovo ao adulto leva aproximadamente dois meses (LELE & KRONE, 1996; MATTINGLY et al., 2009). A embriogênese possui uma duração aproximada de 24h e a organogênese apresenta seu estágio final no quinto dia de desenvolvimento (DAHM, 2002; DAHM et al., 2006). A transparência do córion e a translucência do embrião e das fases larvais iniciais permitem uma fácil visualização dos processos internos, como a formação e função de órgãos em um animal vivo (DAHM et al., 2006). Além disto, esta característica dos embriões de peixe zebra favorece a expressão de genes fluorescentes e permite monitorar a expressão e atividade de muitos genes (GILMOURT et al., 2002), tornando-os suscetíveis à manipulação e à microinjeção (LELE & KRONE, 1996).

Além disso, o peixe zebra possui diversas características favoráveis, tais como: baixo custo, requer pouco espaço para manutenção, rápido desenvolvimento e ciclo biológico, fácil manipulação, seu comportamento pode ser facilmente observado e quantificado em um ambiente controlado (SLOMAN et al., 2003), e ainda, seu pequeno tamanho, a sensibilidade para drogas, e o rápido metabolismo (ATCHINSON et al., 1987; KARLOVICH et al., 1998; GOLDSMITH, 2004).

Nos últimos anos, houve um progresso considerável no conhecimento genético e genômico do peixe zebra (POSTLETHWAIT et al., 2000; WOODS et al., 2000). Em 2001, o Instituto Sanger começou o seqüenciamento do genoma desta espécie (VOGEL, 2000). A seqüência do genoma mitocondrial já é conhecida, servindo de base para estudos filogenéticos (BROUGHTON et al., 2001). O estudo do genoma do peixe zebra pode servir como um complemento funcional para o projeto genoma humano, o qual produz enormes quantidades de seqüências, mas carece de informações funcionais para a maioria dos genes identificados (DOOLEY & ZON, 2000). Além disso, os genes deste teleósteo são evolutivamente conservados e apresentam um alto grau de sintonia com os genes humanos e de camundongo (BARBAZUK et al., 2000; LISCHKE & CURRIE, 2007). Entretanto, em algum momento da evolução dos teleósteos, houve um evento completo de duplicação genômica, fato que não ocorreu entre os mamíferos (CROLLIUS & WEISSENBACH, 2005). Mesmo que apenas uma pequena porção destas duplicações gênicas ainda permaneça, é bastante comum a presença de mais de um gene de função homóloga, chamados de parálogos (TAYLOR et al., 2003).

O interesse pela espécie pode ser observado pelo vasto número de laboratórios que utilizam este teleósteo como modelo experimental em suas pesquisas (SPRAGUE et al., 2001) e pelo crescimento exponencial do número de estudos publicados que envolvem o peixe zebra (ZON & PETERSON, 2005;

LIESCHKE & CURRIE, 2007). Foi criada uma rede de informações na web sobre o peixe zebra, o ZFIN (<http://zfin.org>), na qual laboratórios do mundo inteiro podem depositar um grande número de informações sobre esta espécie (SPRAGUE et al., 2003). Além disso, existe um excelente, compreensivo e freqüentemente atualizado manual de manutenção e controle das condições ideais para a criação deste teleosteo em laboratórios (WESTERFIELD, 2000).

Numerosos avanços em triagens genéticas têm sido obtidos com o peixe zebra. Milhares de mutações distintas estão sendo identificadas, e mais de 400 delas têm sido clonadas (AMSTERDAM et al., 2004). Embora estas triagens genéticas sejam mais informativas a respeito da embriogênese do peixe zebra, a identificação de genes relacionados a patologias humanas tem sido realizada nesta espécie (ZON & PETERSON, 2005; LIESCHKE & CURRIE, 2007). Dentre eles, podem ser citados genes envolvidos na síndrome do rim policístico (OTTO et al., 2003), metabolismo do colesterol (FARBER et al., 2001), regeneração tecidual (POSS et al., 2003), malformações cardíacas (GARRITY et al., 2002; GERULL et al., 2002), anemias (DONOVAN et al., 2000), câncer (AMATRUDA et al., 2002; LANGENAU et al., 2003), transtornos no SNC (LI & DOWLING, 1997) e sistema imune (MATTINGLY et al., 2009). Além disso, já foram identificados muitos tipos de neoplasias no peixe zebra, as quais são semelhantes histologicamente e geneticamente com as de humanos, o que mostra que a biologia do câncer é similar nestes organismos (AMATRUDA et al., 2002). A geração de animais transgênicos pode ser efetivada com alterações em genes específicos relacionados ao câncer (LONG et al., 1997).

Atualmente, a utilização do peixe zebra vem sendo expandida para outras áreas do conhecimento, tais como bioquímica (TAYLOR & RAES, 2004), neurociências (EDWARDS & MICHEL, 2003), toxicologia (HILL et al., 2005),

farmacologia (GOLDSMITH, 2004), biologia do comportamento (GERLAI, 2003; GUO, 2004) e genética biomédica (MARTIN & RENSHAW, 2009). Devido às suas peculiaridades reprodutivas e à presença de semelhanças fisiológicas e genéticas com mamíferos, esta espécie desperta o interesse pela oportunidade de acelerar o processo da descoberta de novas drogas (STERN et al., 2005; KOKEK et al., 2010). Este teleósteo é capaz de absorver de forma rápida os compostos que são diretamente adicionados na água e acumulá-los em diferentes tecidos, principalmente no SNC. Por apresentar um tamanho relativamente pequeno, a quantidade de compostos a ser testada passa a ser relativamente menor, contribuindo com a otimização do uso das drogas em estudo (YAMAZAKI et al., 2002; GOLDSMITH, 2004). Dentre os trabalhos envolvendo aspectos toxicológicos, a exposição a diferentes contaminantes ambientais e componentes farmacológicos, tais como a TCDD (DONG et al., 2002; HILL et al., 2003), pesticidas carbamatos e organofosforados (SENGER et al., 2005), metanol (RICO et al., 2006), metais pesados (SENGER et al., 2006; ROSEMBERG et al., 2007a) e fármacos antipsicóticos (SEIBT et al., 2008) já foi estudada no SNC de peixe zebra.

Exposições a drogas de abuso, tais como nicotina e etanol já estão sendo estudadas neste teleósteo (LEVIN et al., 2007; GERLAI et al., 2006). Evidências demonstram que o tratamento agudo com etanol é capaz de modificar diversos parâmetros comportamentais no peixe zebra (GERLAI, 2003; SISON & GERLAI, 2010). Dentre estes, podem ser destacados a atividade locomotora, interação social, agressividade e comportamento antipredatório (GERLAI et al., 2000; FERNANDES & GERLAI, 2009). Estudos envolvendo exposição crônica ao etanol têm sido realizados e os resultados corroboram com a hipótese do peixe zebra ser um excelente modelo vertebrado que mimetiza aspectos característicos do alcoolismo (GERLAI et al., 2006; GERLAI, 2009). Os efeitos do tratamento com nicotina na

memória deste animal também já foram relatados (LEVIN & CHEN, 2004; LEVIN et al., 2007). Além disto, existe um amplo espectro de paradigmas comportamentais complexos já descritos para este vertebrado (NINKOVIC & BALLY-CUIF, 2006).

Esta espécie também propicia a realização de muitos estudos para a compreensão das bases moleculares da neurobiologia, identificando genes envolvidos na formação de circuitos neuronais, no comportamento e nos mecanismos envolvidos na neuropatogênese (VASCOTTO et al., 1997; GUO, 2004; 2009). Muitos sistemas de neurotransmissão já foram identificados no peixe zebra tais como: glutamatérgico (EDWARDS & MICHEL, 2002), colinérgico (BEHRA et al., 2002; CLEMENTE et al., 2004; ARENZANA et al., 2005), dopaminérgico (RYU et al., 2006), serotoninérgico (LILLESAAR et al., 2007), histaminérgico (KASLIN & PANULA, 2001), gabaérgico (KIM et al., 2004) e purinérgico (KUCENAS et al., 2003; RICO et al., 2003; SENGER et al., 2004).

Em relação a arsênio e *zebrafish*, estudos têm demonstrado que baixos níveis de arsênio, considerados seguros em água potável, prejudicam a função imune inata e a resistência do hospedeiro a um quadro infeccioso em peixe zebra (NAYAK, 2007). Além disso, evidências demonstram que a estimulação de proteínas de choque térmico é um biomarcador sensível da exposição ao arsênio (WU et al., 2008), e que o arsênio causa apoptose induzida por estresse oxidativo em uma linhagem de célula hepática de peixe zebra (SEOK et al., 2007). Embriões expostos a altas concentrações de arsênio (0.5-10.0mM) apresentam reduzida sobrevivência e anormal desenvolvimento, crescimento e morfologia alterados. Além disso, alterada proliferação celular e estado de apoptose, bem como padrão anormal de metilação do DNA foram detectados em embriões tratados com arsenito (LI et al., 2009). Estudos comportamentais e bioquímicos demonstraram que três concentrações de As(V) prejudicaram a memória de longa duração e aumentaram a

oxidação de proteínas, o que sugere um efeito amnésico e pró-oxidante do As(V) (DE CASTRO et al., 2009). Além disso, foi demonstrado que o arsênio afeta as respostas antioxidantes, aumentando a atividade da glutamato cisteína ligase e os níveis de glutathione em peixe zebra, mesmo em concentrações consideradas seguras pela legislação brasileira (VENTURA-LIMA et al., 2009).

1.4. Sistema Purinérgico

A sinalização purinérgica é um sistema evolutivamente ancestral, envolvido em muitos mecanismos neuronais e não neuronais e em eventos de curta e longa duração, incluindo respostas imunes, inflamação, dor, agregação plaquetária, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e morte celular (BURNSTOCK, 2004; 2008; TSUDA et al., 2009).

Os nucleosídeos e nucleotídeos exercem um papel de moléculas sinalizadoras extracelulares em vários tecidos, através dos receptores purinérgicos (BURNSTOCK & KNIGHT, 2004). Diversas evidências têm demonstrado o importante papel desempenhado por essas moléculas, entre elas o ATP e a adenosina, no sistema nervoso central (SNC) (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998; ABBRACCHIO et al., 2009).

O ATP é uma importante molécula sinalizadora no espaço extracelular e desempenha importantes papéis em condições fisiológicas e patológicas (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998; BURNSTOCK, 2007). O ATP é armazenado em vesículas pré-sinápticas e após despolarização neuronal é liberado atuando em receptores específicos na membrana pós-sináptica, sendo considerado um neurotransmissor (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). O ATP pode ser co-liberado juntamente com vários outros neurotransmissores, como a acetilcolina, glutamato, noradrenalina,

serotonina e ácido γ -amino butírico (GABA) (DI IORIO et al., 1998; BURNSTOCK, 1999; BURNSTOCK, 2004).

O ATP exerce suas funções através da ativação de receptores purinérgicos do tipo P2. Este grupo de purinoreceptores é subdividido em duas famílias distintas: P2X e P2Y (RAVELIC & BURNSTOCK, 1998). A família P2X consiste em receptores ionotrópicos que apresentam permeabilidade rápida e seletiva para cátions (Na^+ , K^+ e Ca^{2+}) e está dividida em sete membros (P2X₁₋₇), que estão distribuídos em neurônios, células gliais e no músculo liso (RAVELIC & BURNSTOCK, 1998; BURNSTOCK, 2004). A família P2Y consiste em receptores metabotrópicos e foram funcionalmente descritos oito membros (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄) (BURNSTOCK, 2006). Esta seqüência de números descontínuos se deve ao reconhecimento de que certos receptores foram erroneamente identificados como integrantes desta família, sendo então posteriormente retirados desta classificação (RAVELIC & BURNSTOCK, 1998). Os receptores P2Y apresentam uma ampla distribuição nos tecidos e sistemas, tais como: vascular, nervoso e cardíaco (BURNSTOCK, 2004).

Uma vez liberado no espaço extracelular, o ATP pode ser metabolizado pela ação de ecto-enzimas que fazem a conversão deste nucleotídeo até adenosina (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON et al., 2006). A adenosina não é descrita classicamente como neurotransmissor, pois não é armazenada em grânulos sinápticos ou liberada de forma quântica, sendo classificada como neuromodulador (AGRANOFF et al., 1999).

A adenosina é um neuromodulador endógeno que influencia em muitas funções do SNC (CUNHA, 2001). Tem sido reconhecida como um importante modulador da neurotransmissão excitatória e agente neuroprotetor em diferentes

patologias relacionadas ao SNC, tais como na isquemia, hipóxia (FREDHOLM, 1997; RIBEIRO et al., 2003) e epilepsia (VIANNA et al., 2005).

A concentração extracelular de adenosina é um fator determinante dos efeitos neuromoduladores desta molécula. A adenosina exerce seus efeitos através da ativação de receptores de membrana específicos: A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 , sendo todos acoplados a proteína G e exibindo sete domínios transmembrana formados por aminoácidos hidrofóbicos (DUNWIDDIE & MASINO, 2001; FREDHOLM et al., 2001; PEARSON et al., 2003; RIBEIRO et al., 2003). Os receptores A_1 e A_{2A} apresentam alta afinidade pela adenosina, enquanto os receptores A_{2B} e A_3 são de baixa afinidade (RIBEIRO et al., 2003).

Devido a este papel neuromodulador, a adenosina está envolvida na regulação de importantes mecanismos no SNC, como estados de ansiedade (EL YACOUBI et al., 2000), sono (PORKKA-HEISKANEN, 1999), cognição e memória (RIBEIRO et al., 2003). Além disso, este nucleosídeo apresenta especial importância nos estudos de patofisiologias, como na doença de Parkinson (FREDDUZZI et al., 2002) e na esquizofrenia (LARA et al., 2001).

Na sinalização purinérgica, existe um eficiente mecanismo de inativação, no qual ATP, ADP e AMP são hidrolisados a adenosina por uma cascata enzimática constituída pela via das ectonucleotidases (ROBSON et al., 2006). Além de ser formada a partir da hidrólise do ATP através da ação dessas enzimas, a adenosina pode ser produzida no meio intracelular e transportada para o meio extracelular através de transportadores específicos bidirecionais, que mantêm os níveis intracelulares e extracelulares de adenosina em equilíbrio. A adenosina extracelular também pode ser formada a partir da degradação do monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) (LATINI & PEDATA, 2001).

A clonagem e caracterização molecular dos receptores P2X do peixe zebra já foram realizadas (NORTON et al., 2000; EGAN et al., 2000; DIAZ-HERNANDES et al., 2002). Kucenas e colaboradores (2003) mostraram que a subunidade P2X possui nove membros, sendo seis ortólogos à genes dos receptores P2X de mamíferos, dois parálogos e um gene ainda precisa ser devidamente classificado (KUCENAS et al., 2003). Os subtipos dos receptores P2X do peixe zebra contêm resíduos altamente conservados, os quais são encontrados nas subunidades de mamíferos. Até o momento, na família de receptores P2Y foram identificados oito proteínas funcionais (RALEVIC & BURSNTOCK, 1998; ILLES & RIBEIRO, 2004), e apenas foram identificados receptores P2Y1 em trombócitos de peixe zebra (GREGORY & JAGADEESWARAN, 2002). Recentes estudos identificaram o receptor de adenosina A_{2A} em sistema nervoso central de peixe zebra e demonstraram que a cafeína, um antagonista dos receptores A_{2A} , é neuroprotetora sobre a perda seletiva de neurônios dopaminérgicos em embriões de peixe zebra (BOEHMLER et al., 2009).

1.4.1. Ectonucleotidases

Os nucleotídeos extracelulares são degradados por uma cascata de hidrólise extracelular que resulta na formação do respectivo nucleosídeo e fosfato livre (ZIMMERMANN, 2000). Esta cascata é realizada por uma variedade de enzimas que estão localizadas na superfície celular, chamadas de ectonucleotidases. As ectonucleotidases estão ancoradas na membrana celular, possuindo seu sítio ativo voltado para o meio extracelular, ou estão presentes na forma solúvel no meio intersticial. Estas enzimas são responsáveis pelo controle dos níveis extracelulares de ATP e adenosina. Dentre elas, destacam-se a família das NTPDases (nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases) e a ecto-5'-nucleotidase (CD73, E.C.3.1.3.5),

capazes de controlar a disponibilidade de ligantes como ATP e adenosina aos seus receptores específicos (ZIMMERMANN, 2001).

As NTPDases realizam a hidrólise de nucleotídeos trifosfatados e difosfatados (ZIMMERMANN, 2001). Quatro das NTPDases estão localizadas na superfície das células, com um sítio catalítico extracelular (NTPDase 1, 2, 3 e 8).

As NTPDases 5 e 6 apresentam localização intracelular e as NTPDases 4 e 7 são enzimas intracelulares cujos centros ativos estão direcionados para o lúmen das organelas citoplasmáticas (ROBSON et al., 2006). Estas enzimas hidrolisam tanto ATP como ADP, formando AMP na presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} . O AMP formado é então convertido a adenosina pela 5'-nucleotidase (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON et al., 2006).

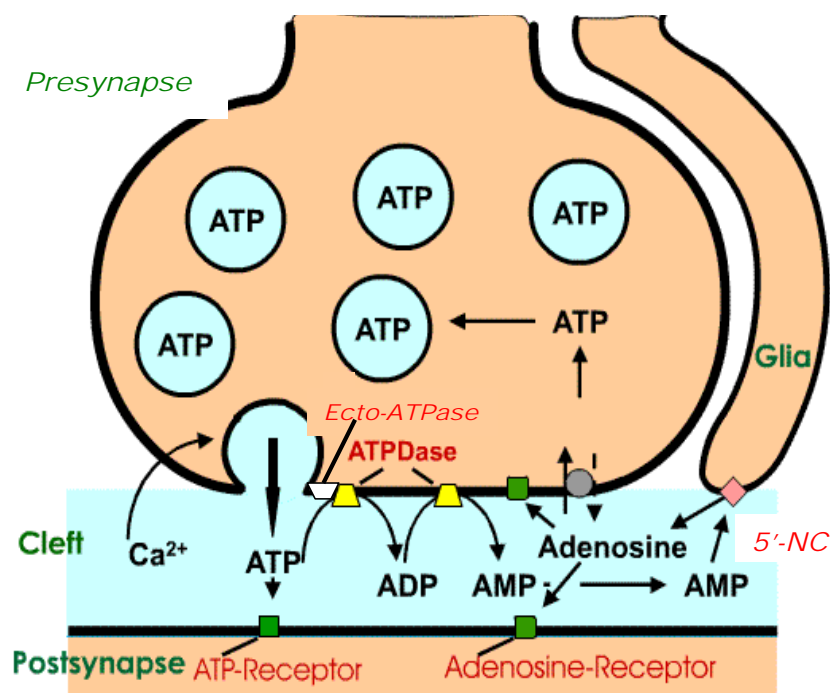


Figura 2. Modelo esquemático de uma sinapse purinérgica. O ATP pode ser liberado através de vesículas na fenda sináptica, onde pode agir nos receptores P2 e/ou ser hidrolisado ao neuromodulador adenosina por ação de ectonucleotidases. A adenosina pode agir nos receptores P1. (Modificado de www.biozentrum.uni-frankfurt.de/prof/zimmermann).

As 5'-nucleotidasas constituem uma família de enzimas com distribuição tecidual ampla e com capacidade de produzir nucleosídeos a partir de nucleotídeos 5'-monofosfatados (ZIMMERMANN, 1996; BIANCHI & SPYCHALA, 2003). Diferentes distribuições subcelulares são encontradas para os membros da família das 5'-nucleotidasas, existindo formas solúveis e formas ancoradas à membrana (BIANCHI & SPYCHALA, 2003). A participação da ecto-5'-nucleotidase na via das ectonucleotidasas exerce um papel modulador sobre a produção de adenosina extracelular, sendo a enzima marca-passo desta cascata enzimática (ZIMMERMANN, 1996; CUNHA, 2001).

No peixe zebra, estudos demonstraram a presença de uma atividade NTPDásica e uma ecto-5'-nucleotidase em membranas cerebrais. Estas duas atividades enzimáticas foram caracterizadas como cátion-dependentes, apresentando atividade máxima à temperatura de 37 °C, pH ótimo entre 7,2 e 8,0, Km na faixa do micromolar e uma ampla especificidade por outros nucleotídeos (RICO et al., 2003; SENGER et al., 2004). As ectonucleotidasas desempenham uma função essencial na neurotransmissão purinérgica, controlando a disponibilidade e os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares e, conseqüentemente a ativação dos purinoreceptores P2 e P1 (ZIMMERMANN, 2001).

Existem poucos estudos avaliando a toxicidade de metais pesados sobre as ectonucleotidasas. OLIVEIRA e colaboradores (1994) verificaram o efeito *in vitro* e *in vivo* do cloreto de mercúrio na atividade da ATP difosfohidrolase, enzima envolvida na degradação de nucleotídeos extracelulares, em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos em desenvolvimento. O estudo demonstrou uma inibição significativa *in vitro* do cloreto de mercúrio, não observando alterações nesta atividade enzimática após tratamento *in vivo*. MORETTO e colaboradores (2004) avaliaram o efeito do tratamento *in vivo* subcrônico com cloreto de mercúrio na atividade da NTPDase, 5'-

nucleotidase e acetilcolinesterase de córtex cerebral de ratos. Os dados mostraram um aumento significativo na atividade da NTPDase, mas não foram observadas mudanças significativas na atividade da 5'-nucleotidase. SENGER et al. em 2006 demonstraram que a exposição *in vitro* e *in vivo* ao cloreto de mercúrio e ao acetato de chumbo promove alterações significativas na hidrólise de nucleotídeos em membranas cerebrais de peixe zebra. O cloreto de mercúrio inibiu *in vitro* a hidrólise de ATP, ADP e AMP de uma forma dependente da concentração. Os resultados obtidos nos experimentos duplo-recíprocos indicaram que a inibição promovida pelo cloreto de mercúrio na hidrólise de ATP e ADP foi incompetitiva e a inibição da hidrólise do AMP foi não-competitiva.

Muitos estudos demonstraram a presença de ectonucleotidases como a NTPDase (SARKIS & SALTÓ, 1991; SCHETINGER et al., 2001) e 5'-nucleotidase (VOGEL et al., 1992; VOLKNANDT, 1991) em teleósteos. Em peixe zebra, estudos do nosso laboratório demonstraram a presença de uma NTPDase e uma ecto-5'-nucleotidase em membranas cerebrais (RICO et al., 2003; SENGER et al., 2004). Estas enzimas possuem características cinéticas similares às ectonucleotidases já descritas em mamíferos como: 1) dependência a cátions divalentes; 2) pH ótimo para sua atividade na faixa de 7.0 a 8.0; 3) K_M na faixa de micromolar; 4) ampla especificidade de substrato, hidrolisando nucleosídeos trifosfatados e difosfatados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Considerando que: (1) o peixe zebra é um importante modelo experimental em estudos toxicológicos, que (2) o sistema purinérgico exerce um importante papel na sinalização no SNC e (3) receptores e enzimas envolvidos nestes sistemas de neurotransmissão já foram descritos nesta espécie, o objetivo geral deste estudo é avaliar o efeito do arsênio na atividade de enzimas envolvidas no controle dos níveis de ATP, ADP e AMP em cérebros de peixe zebra e avaliar os parâmetros comportamentais desta espécie após exposição ao arsênio.

2.2. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste estudo são:

- Avaliar o efeito *in vivo* da exposição subcrônica (96 horas) ao arsênio sobre a hidrólise de ATP, ADP e AMP em membranas cerebrais de peixe zebra;
- Avaliar alterações comportamentais no peixe zebra induzidas pelo arsênio, através da análise da atividade locomotora e parâmetros relacionados à ansiedade.

CAPÍTULO 2

MANUSCRITO

Arsenic alters ectonucleotidase activities and behavioral parameters in zebrafish (*Danio rerio*)

Luis Antonio Baldissarelli, Katiucia Marques Capiotti, Mauricio Reis Bogo, Gabriele Ghisleni, Carla Denise Bonan

(Artigo submetido ao Periódico Environmental Toxicology)

Arsenic alters ectonucleotidase activities and behavioral parameters in zebrafish (*Danio rerio*)

Luis Antonio Baldissarelli¹, Katiucia Marques Capiotti¹, Mauricio Reis Bogo², Gabriele Ghisleni¹, Carla Denise Bonan^{1,*}

¹ Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Correspondence to: Carla Denise Bonan, Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, PUCRS. Av. Ipiranga, 6681 Prédio 12D, Sala 340, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3353 4158; fax: +55 51 33203612.

E-mail address: cbonan@pucrs.br

Running title: Arsenic alters nucleotidases and locomotion

Abstract

This study shows that arsenic is able to promote significant changes in locomotor activity, anxiety, and in the extracellular nucleotide hydrolysis. After a 96-h exposure to different concentrations of arsenic, there was a decrease in the locomotor activity at 5 mg/L. In addition, animals treated with arsenic increased the time spent in the middle and lower zone in the tank, suggesting an anxiogenic effect of arsenic. Considering that behavioral parameters, such as anxiety and locomotion, can be modulated by the purinergic system, we also evaluated the extracellular nucleotide hydrolysis after a 96-h arsenic exposure. Arsenic promoted a significant decrease in ATP and ADP hydrolysis at 0.05 mg/L (37.6% and 25%, respectively), 5 mg/L (34.8% and 38%, respectively), and 15 mg/L (30.6% and 41%, respectively) when compared to control group. In relation to ecto-5'-nucleotidase activity, the results showed that arsenic promoted a significant inhibition of this enzyme at 0.05 mg/L (37.7%), 5 mg/L (26.7%), and 15 mg/L (35%) when compared to control group. These findings demonstrated that arsenic affected behavioral parameters and the extracellular nucleotide hydrolysis in zebrafish, suggesting that purinergic system can be a target of neurotoxic effects induced by arsenic.

Key words: arsenic; ectonucleotidases; locomotion; zebrafish; Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase; ecto-5'-nucleotidase.

INTRODUCTION

In recent years, concerns have arisen with human exposure to arsenic levels (Bagli et al., 1996, Nickson et al., 1998). Arsenic is derived from natural and anthropogenic sources in the environment. The biogeochemical cycling of arsenic and the natural flow of this element in the biosphere have been altered due to the increasing mining activity and use of pesticides and wood preservatives among others, resulting in contamination of soil and other ecosystem components (Accioly et al., 2000). Arsenic exists in the environment in a variety of chemical forms, including organic and inorganic species as a result of the participation in complex chemical and biological processes (Stummeyer et al, 1996).

The high levels of arsenic toxicity are well known, since compounds are easily absorbed, either orally or by inhalation, and the extent of absorption is related to the solubility of the compound (Demesmay et al., 1994). Exposure to arsenic leads to diseases, such as conjunctivitis, hyperkeratosis, hyperpigmentation, cardiovascular diseases, disorders of the peripheral and central nervous systems, skin cancer, and gangrene in the limbs (Anderson et al., 1986). The effects of arsenic manifest weeks after first exposure as both central and peripheral neuropathy. Impairment of important neurological functions, such learning, short-term memory and attention, can be caused by the central neuropathy due to arsenic poisoning. Neuropsychological tests showed mildly impaired psychomotor and attentive processes whereas verbal learning and memory were severely impaired (Vahidnia et al., 2007). Although there is evidence that arsenic exposure has a toxic effect on the nervous system, there are few studies that address this issue. Studies have shown that cholinergic, monoaminergic, gabaergic, and monoaminergic systems may be a target of neurotoxic effects induced by arsenic (Kobayashi et al., 1987; Nagaraja and Desiraju, 1993; Kannan et al., 2001; Rodriguez et al., 2003); however, there are no studies investigating the effects of arsenic on purinergic system.

ATP is an early signaling molecule, considered as a neurotransmitter in the central nervous system and performs its functions when it is released into the synaptic cleft in a calcium-dependent manner (Burnstock, 1997; Cunha and Ribeiro, 2000). It is stored in presynaptic vesicles and is released after depolarization acting on specific receptors on the postsynaptic membrane (Ravelic and Burnstock, 1998). ATP can be co-released along with several other neurotransmitters, such as acetylcholine, glutamate, norepinephrine, serotonin, and acid γ -amino butyric acid (GABA) (Burnstock, 1999; Burnstock, 2004). ATP activates P2 purinoceptors, which are subdivided into two distinct families: ionotropic P2X and metabotropic P2Y receptors (Ravelic and Burnstock, 1998).

ATP can be degraded by a cascade of enzyme families located on the cell surface and called ectonucleotidases, which are responsible for controlling the levels of extracellular ATP and adenosine. Ectonucleotidases constitute a highly refined system for the regulation of nucleotide-mediated signaling, controlling the rate, amount, and timing of nucleotide degradation and production. The hydrolysis of ATP to AMP is catalyzed mainly by a family of ectonucleotidases, named nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases). The nucleotide AMP is hydrolyzed to adenosine, an important neuromodulator, by the action of an ecto-5'-nucleotidase (CD73, EC3.1.3.5).

(Zimmermann, 2001; Robson et al., 2006).

Zebrafish is a biological model consolidated in neuroscience and toxicology studies (Linney et al., 2004). The genome project of this animal is nearly completed, and studies have shown an alignment of the zebrafish genome with the human genome (Barbazuk et al. 2000; Vogel, 2000, Stern and Zon, 2003). P2 purinoceptors have been identified in zebrafish (Kucenas et al., 2003) and we have also characterized the presence of NTPDases and ecto-5'-nucleotidase in brain membranes of zebrafish (Rico et al., 2003; Senger et al., 2004). Furthermore, previous studies from our laboratory have shown that metals, such as mercury, lead, zinc, copper, and cadmium are able to induce significant changes in the enzymes

involved in extracellular nucleotide hydrolysis in zebrafish brain (Senger et al., 2006; Rosemberg et al., 2007).

Considering that arsenic is an important environmental pollutant and induces impairment in several neurological functions, we investigated the effect of arsenic exposure on locomotion and anxiety in zebrafish. Since these behavioral parameters can be modulated by the purinergic system, in this study we also evaluated the extracellular nucleotide hydrolysis promoted by NTPDases and ecto-5'-nucleotidase activities after 96-h exposure to arsenic in zebrafish brain.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Experimental animals

Adult Zebrafish (*Danio rerio*) of both sexes were obtained from commercial supplier and were kept for at least 7 days before the experiments in 50-L thermostated aquarium filled with unchlorinated and constantly aerated water $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Fish were kept on a 14/10h light/dark cycle (with lights turning on at 7:00 am). They were used according to the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” published by the US National Institutes of Health (NIH publication N° 85–23, revised 1996), being healthy and free of any signs of disease. The Ethics Committee of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS) approved the protocol under the number 08/00058–CEUA.

2.2 In vivo treatment

Fish were exposed during 96 hours to three concentrations of sodium arsenate (Na_2HAsO_4), (0.05, 5, and 15 mg As/L) (Chattopadhyay et al., 2002; Hermann and Kim, 2005; Ramirez and Garcia, 2005). The pH of water was measured once a day during the treatment for the control of water conditions (pH 7.0, 7.20 mg O_2/L). A control group was run in

parallel ($n = 20/\text{group}$), employing only tap water with the same characteristics mentioned above.

2.3 Behavioral assessments

After the *in vivo* treatments described in subsection 2.2, behavioral testing of arsenic effects took place during the light phase between 10:00 a.m. and 5:00 p.m. Animals were individually placed into the experimental tank (30 x 15 x 10 cm, length x height x width) after the 96-h arsenic treatment and were first habituated to the test tank for 30 seconds, as previously described (Gerlai et al., 2000). There was no drug exposure during behavioral experiments. The locomotor activity was videorecorded for 5 minutes after the habituation period and simultaneously analyzed using the ANY-Maze recording software (Stoelting Co., Wood Dale, Illinois). The tank was divided into equal sections with four vertical lines and one horizontal lines, and the following behavior patterns were measured: number of line crossings (vertical and horizontal lines), distance travelled, mean speed, and anxiety. Visual observations throughout the experimental periods allow the documentation of erratic movements, defined as sharp changes in direction or velocity and repeated rapid darting behaviors (Levin et al., 2007)

2.4 Preparation of Brain Membranes of Zebrafish

The brain membranes were prepared as described previously by Barnes et al. (1993). Zebrafish were euthanized by decapitation, their brains were removed from the cranial skull by the dissection technique. For each sample (membrane preparation), a pool of five zebrafish brains was used which were briefly homogenized in 60 volumes (v/w) of chilled Tris–citrate buffer (50 mM Tris, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, pH 7.4, with citric acid) in a motor driven Teflon–glass homogenizer. The homogenate was centrifuged at 800 x g for 10 minutes at 4 °C. The supernatant was centrifuged for 25 min at 40 000 x g. The resultant pellet was frozen

in liquid nitrogen, thawed, resuspended in Tris–citrate buffer, and centrifuged for 20 min at 40 000 x g. This fresh-thaw-wash procedure was used to ensure the lysis of the brain membranes. The final pellet was resuspended and used in the enzyme assays. All samples were maintained at 2–4 °C throughout preparation.

2.5 Enzyme Assays

NTPDase and 5'-nucleotidase assays were performed as described previously (Rico et al., 2003; Senger et al., 2004). Zebrafish brain membranes (3 µg protein for NTPDase and 5 µg protein for ecto-5'-nucleotidase) were added to the reaction mixture containing 50 mM Tris–HCl (pH 8.0) and 5 mM CaCl₂ (for the NTPDase activity) or 50 mM Tris–HCl (pH 7.2) and 5 mM MgCl₂ (for the ecto-5'-nucleotidase activity) at a final volume of 200 µl. The samples were preincubated for 10 min at 37 °C and the reaction was initiated by the addition of substrate (ATP, ADP or AMP) to a final concentration of 1 mM. The reaction was stopped after 30 min by the addition of 200 µl trichloroacetic acid at a final concentration of 5%. The samples were chilled on ice for 10 min and 1 ml of a colorimetric reagent composed of 2.3% polyvinyl alcohol, 5.7% ammonium molybdate, and 0.08% malachite green was added in order to determine the inorganic phosphate released (Pi) (Chan et al., 1986). After 20 min, the quantification of inorganic phosphate (Pi) released was determined spectrophotometrically at 630 nm. Incubation times and protein concentrations were chosen to ensure the linearity of the reactions. Controls with the addition of the enzyme preparation after mixing with trichloroacetic acid were used to correct non-enzymatic hydrolysis of substrates. Specific activity was expressed as nanomoles of Pi released per minute per milligram of protein. All enzyme assays were run at least in triplicate.

2.6 Protein determination

Protein was determined by Coomassie Blue method using bovine serum albumin as a standard (Bradford, 1976).

2.7 Statistical Analysis

Nucleotidases activities for each substrate (ATP, ADP and AMP) were evaluated by analysis of one-way ANOVA followed by Tukey test, when necessary. Behavioral data were analyzed by one-way ANOVA or repeated measure ANOVA, followed by Newman-Keuls post-hoc test. * $p < 0.05$ denotes a significant difference from control group.

3. RESULTS

Distinct parameters of zebrafish swimming activity were evaluated in an open field task after a 96-h exposure to different arsenic concentrations (0.05 mg/L, 5 mg/L, and 15 mg/L). As indexed by the number of line crossings in the apparatus there was a decrease in locomotor activity of animals submitted to 5 mg/L arsenic (30.5%) when compared with control group (278.63 ± 64.34 line crossings) (Figure 1A). We showed that the distance traveled and the mean speed evaluated during the 5 minutes of behavioral task were not altered by arsenic exposure in all concentrations tested in relation of control animals (17.44 ± 3.5 meters; 0.058 ± 0.011 m/s, respectively) (Fig 1B and 1C). The turning behavior has been analyzed using the parameter of absolute turn angle that displays the degrees of fish turn per second, indicating the direction of the movement. Zebrafish exposed to all arsenic concentrations tested did not show significant changes in the absolute turn angle during the 5-min evaluation of the task (Fig. 1D).

Time spent in the top third of the tank was not altered between groups tested with different arsenic concentrations (Figure 1E). The time spent in the middle zone was significantly decreased at 0.05 mg/L (55%), 5 mg/L (62%) and 15 mg/L (62%) when compared to control group (50.05 ± 29 s) (Figure 1F). In addition, the time spent in the bottom

zone is significantly increased (28%) only in the group treated with 5 mg/L arsenic when compared to control ($209.8 \pm 65s$) (Figure 1G).

The effects of arsenic on NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities were observed in brain membranes of zebrafish after the 96-h exposure to arsenic at three different concentrations (0.05 mg/L, 5 mg/L, and 15 mg/L). Arsenic promoted a significant decrease in ATP and ADP hydrolysis at 0.05 mg/L (37.6% and 25%, respectively), 5 mg/L (34.8% and 38%, respectively), and 15 mg/L (30.6% and 41%, respectively) when compared to control (Figure 2A and 2B). In relation to ecto-5'-nucleotidase activity, the results showed that arsenic also promoted a decrease of AMP hydrolysis at 50 μ g/L (37.7%), 5 mg/L (26.7%), and 15 mg/L (35%) when compared to control group (Figure 2C).

DISCUSSION

This study shows that arsenic promoted significant alterations in locomotion, anxiety, and extracellular nucleotide hydrolysis. After a 96-h exposure to different concentrations of arsenic, there was a decrease in the locomotor activity at 5 mg/L. In addition, animals treated with arsenic increased the time spent in the middle and lower zone of the tank, suggesting an anxiogenic effect of arsenic.

These results are in agreement with data from literature, in which it is observed that the arsenic has a tendency to alter locomotor activity. In studies with mice exposed to arsenic trioxide for 14 days, it was observed a biphasic response in locomotor activity. A lower dose of arsenic trioxide (3 mg/kg) increased locomotor activity whereas a higher dose (10 mg/kg) decreased it (Itoh et al., 1990). Pryor et al. (1983) reported a decrease in locomotor activity of rats exposed to 1.5, 3.0, 6.0, and 12 mg/kg arsenic trioxide. This effect disappeared 3 weeks after the interruption of the administration. Rats exposed to sodium arsenite at 10 and 20 mg/kg for 15 or 30 days showed a reduction in locomotor activity, which was reversed after the interruption of arsenic exposure (Rodriguez et al., 2001). Therefore, the most consistent

change in behavior of rats after administration of arsenic trioxide, arsenic, sodium arsenate or sodium arsenite was a decrease in locomotor activity (Rodriguez et al., 2001).

Studies have also shown that arsenic can alter other behavioral parameters, such as memory. De Castro et al. (2009) evaluated the exposure to arsenic at a concentration of 0.01 mg/L As(V) and observed an impairment in the long-term memory in zebrafish in an inhibitory avoidance task. Rodriguez et al. (2002) demonstrated that animals exposed to arsenite from 15-day gestational period to approximately 4 months of age showed increased spontaneous locomotor activity and a delay in spatial learning task. Furthermore, exposed offspring showed longer latency to approach a novel object than controls in an object recognition task. In the 8-way radial arm maze, arsenic offspring had a significant increase in the number of entry errors compared to controls. Results suggest that moderate exposure to perinatal arsenic can significantly reduce corticosterone receptor levels in the hippocampus and can have adverse effects on learning and memory behavior (Martinez-Finley et al., 2009). However, there is no evidence on effects of arsenic on anxiety parameters.

Zebrafish have a natural tendency to initially remain at the bottom of a novel environment (e.g., a test tank) and then gradually explore the higher portions of the test tank (Levin et al, 2007; Egan et al, 2009). Levin et al (2007) have proposed that height in the tank may be an useful measure of anxiety that resembles thymogtaxis observed in rodents. Indeed, acute nicotine (Levin et al, 2007), buspirone (Bencan et al, 2009), and chronic fluoxetine (Egan et al, 2009) treatments reduce bottom-dwelling; however, results of the benzodiazepines, diazepam and chlordiazepoxide, were inconsistent in this task (Bencan et al, 2009). Our results showed that arsenic can induce an anxiogenic effect on zebrafish, because these animals remained a longer time in the middle and lower zone of the tank.

Changes in several neurotransmitter systems may explain some neurotoxicological actions of metals. Considering that behavioral parameters, such as anxiety and locomotion, can be modulated by the purinergic system, in this study we also evaluated the extracellular

nucleotide hydrolysis after a 96-h exposure to arsenic. Nucleotides are important extracellular messengers in both physiological and pathological conditions. After its release in the synaptic cleft, the ATP can be catabolized to ADP, AMP, and adenosine. Therefore, the effect of the nucleotides in cells may be controlled by extracellular catabolism mediated by ectonucleotidases, which regulate the concentration of ATP/ adenosine and P2/P1 receptor-mediated responses. Our findings showed that arsenic reduces significantly ATP, ADP, and AMP hydrolysis promoted by NTPDases and ecto-5'-nucleotidase in zebrafish brain membranes. The decrease of ATP, ADP, and AMP hydrolysis induced by arsenic suggests an increase of ATP levels and consequently a decrease of adenosine levels in the synaptic cleft. Studies have shown that ATP in high concentrations can cause cytotoxic effects (Chow et al., 1997). Extracellular ATP can also induce apoptosis through P2X₇ receptors (Lepine et al., 2006) and the activation of these receptors involves PKC/MAPK signaling pathway in rat brain astrocytes (Wang et al., 2003). Therefore, the effects of arsenic on ectonucleotidases might induce an increase of ATP levels, which could be one of the mechanisms involved in the neurotoxicity induced by arsenic. Furthermore, a possible decrease of adenosine levels by ectonucleotidase pathway after arsenic subchronic exposure could influence the interaction with P1 purinoceptors and consequently alter the neuromodulatory effect of this nucleoside. Similar effects induced by lead, mercury (Senger et al., 2006), and copper (Rosemberg et al., 2007) have been observed on ectonucleotidases in zebrafish brain membranes.

Arsenic also acts as a generator of oxidative stress. Previous studies indicate that arsenic can cause disturbances in the antioxidant system in zebrafish through changes in the concentrations of glutathione levels (GSH), and glutamate cysteine ligase (GCL) activity (Ventura-Lima et al., 2009). Arsenic is a potent inhibitor of pyruvate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase enzymes. A reduction in these two enzymes can inhibit the citric acid cycle, decrease the generation of reducing molecules as NADH and NADPH, impairing the production of ATP (Ramanathan et al, 2003; Tseng, 2004). In addition, inorganic arsenic

species can affect the NADH dehydrogenase and cytochrome c oxidase. The decline of these two enzymes results in inhibition of electron flow from NADPH to oxygen, increasing the possibility of generation of reactive oxygen species (ROS) and decreasing oxygen consumption. Thus, a reduction in the capacity of ATP synthesis may impair the GSH synthesis, favoring a scenario of oxidative stress. Evidence shows that ROS are involved in arsenic toxicity, leading to oxidative damage of DNA, proteins, and lipids (BAU et al. 2002, SHI et al., 2004).

Currently, the use of zebrafish is spreading to other areas of knowledge, such as Chemistry (Taylor and Raes, 2004), Neuroscience (Edwards and Michel, 2003; Gerlai, 2003; Guo, 2004), Toxicology (Hill et al., 2005) and Pharmacology (Goldsmith, 2004). This teleost is able to quickly absorb the compounds that are added directly to the water and accumulate them in different tissues, especially in the CNS. Therefore, this species enables to accelerate the process of drug discovery and the understanding of toxicological effects induced by several aquatic contaminants. Exposure to various environmental contaminants such as TCDD (Dong et al., 2002), pesticides, carbamates and organophosphates (Senger et al., 2005), methanol (Rico et al., 2006), and heavy metals (Senger et al. 2006; Rosemberg et al., 2007) has been studied in zebrafish central nervous system. It makes this species an important biological model to be used as an indicator of water pollution. Thus, the evaluation of neurochemical and behavioral parameters in zebrafish is a valuable tool to increase the knowledge about the potential neurotoxic targets of arsenic.

In summary, this study investigated the effects of subchronic arsenic treatment on locomotor activity and on NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in zebrafish. The alterations in ectonucleotidases after arsenic treatment can be a factor involved in the neurotoxic and behavioral effects induced by this contaminant on CNS.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and by the FINEP research grant “Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)” 01.06.0842-00. K.M.C. and G.G. were recipient of fellowship from PIBIC/CNPq/PUCRS and FAPERGS, respectively.

REFERENCES

- Accioly AMA, Siqueira JO. 2000. Contaminação química e biorremediação do solo. In. Tópicos em ciência do solo. Viçosa: SBCS, vol.1, p. 299 – 352.
- Anderson AC, Abdelghani AA, Jaghabir M, Mather F. 1986. Arsenic levels in blood, urine, and hair of workers applying monosodium methanearsonate (MSMA). *Arch Environ Health* 41(3):163-169.
- Bagli M, Süverkrüp R, Rao ML, Bode H. 1996. Mean input times of three oral chlorprothixene formulations assessed by an enhanced least-squares deconvolution method. *J Pharm Sci* 85(4):434-9.
- Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, Bedell JA, Mcpherson JD, Johnson SL. 2000. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* 10:1351– 1358.
- Barnes JM, Murphy PA, Kirkham D, Henley JM.1993. Interaction of guanine nucleotides with [3H] kainate and 6-[3H]cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione binding in goldfish brain. *J. Neurochem.* 61: 1685– 1691.
- Bau DT, Wang TS, Chung CH, Wang AS, Wang AS, Jan KY. 2002. Oxidative DNA adducts and DNA-protein cross-links are the major DNA lesions induced by arsenite. *Environ Health Perspect.* 110 Suppl 5:753-6.
- Bencan Z, Sledge D, Levin ED. 2009. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.*94(1):75-80.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 218-254.

- Burnstock G. 1997. The past, present and future of purine nucleotides as signaling molecules. *Neuropharmacol.* 36 (9), 1127-1139.
- Burnstock G. 1999. Purinergic cotransmission. *Brain Res Bull.* 50(5/6):355-357.
- Burnstock G. 2004. Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol* 4:47-52.
- Chan KM, Delfert D, Junger KD. 1986. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -stimulated ATPase activity. *Anal Biochem.* 157(2):375-80.
- Chattopadhyay S, Bhaumik S, Nag Chaudhury A, Das Gupta S. 2002. Arsenic induced changes in growth development and apoptosis in neonatal and adult brain cells in vivo and in tissue culture. *Toxicol Lett.* 128(1-3):73-84.
- Chow SC, Kass GE, Orrenius S. 1997. Purines and their roles in apoptosis. *Neuropharmacology* 36(9):1149-56.
- Cunha RA, Ribeiro, JA. 2000. ATP as a presynaptic modulator. *Life Sci* 68: 119-137.
- Castro MR, Lima JV, de Freitas DP, Valente Rde S, Dummer NS, de Aguiar RB, dos Santos LC, Marins LF, Geracitano LA, Monserrat JM, Barros DM. 2009. Behavioral and neurotoxic effects of arsenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*, Teleostei: Cyprinidae). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 150(3):337-42.
- Demesmay C, Olle M, Porthault M, Fresenius. 1994. Arsenic speciation by coupling high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. Chem* 348: 205.
- Dong W, Teraoka H, Yamazaki K, Tsukiyama S, Imani S, Imagawa T, Stegeman JJ, Peterson RE, Hiraga T. 2002. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in the zebrafish embryo: local circulation failure in the dorsal midbrain is associated with increased apoptosis. *Toxicol Sci.* 69(1):191-201.

- Edwards JG, Michel WC. 2003. Pharmacological characterization of ionotropic glutamate receptors in the zebrafish olfactory bulb. *Neuroscience*. 122(4):1037-47.
- Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavello PR, Elegante MF, Elkhayat SI, Bartels BK, Tien AK, Tien DH, Mohnot S, Beeson E, Glasgow E, Amri H, Zukowska Z, Kalueff AV. 2009. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res* 205(1):38-44.
- Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A. 2000. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav*. 67(4):773-82.
- Gerlai R. 2003. Zebrafish: an uncharted behavior genetic model. *Behav. Genet*. 33(5):461-8.
- Goldsmith P. 2004 Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol* 4(5):504-12.
- Guo S. 2004. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes Brain Behav* 3(2):63-74.
- Hermann AC, Kim CH. 2005. Effects of arsenic on zebrafish innate immune system. *Marine Biotechnol*. 7: 494-505.
- Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci*. 86(1):6-19.
- Itoh T, Zhang YF, Murai S, Saito H, Nagahama H, Miyate H, Saito Y, Abe E.1990, The effect of arsenic trioxide on brain monoamine metabolism and locomotor activity of mice. *Toxicol Lett*. 54(2-3):345-53.
- Kannan GM, Tripathi N, Dube SN, Gupta M, Flora SJ. 2001. Toxic effects of arsenic (III) on some hematopoietic and central nervous system variables in rats and guinea pigs. *J Toxicol Clin Toxicol*.39(7): 675-82.

- Kobayashi H, Yuyama A, Ishihara M, Matsusaka N. 1987. Effects of arsenic on cholinergic parameters in brain in vitro. *Neuropharmacol* 26(12):1707-13.
- Kucenas S, Li Z, Cox JA, Egan TM, Voigt MM. 2003. Molecular characterization of the zebrafish P2X receptor subunit gene family. *Neuroscience* 121: 935–945.
- Lepine S, Le Stunff H, Lakatos B, Sulpice JC, Giraud F. 2006. ATP-induced apoptosis of thymocytes is mediated by activation of P2X7 receptor and involves *de novo* ceramide synthesis and mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta.* 1761(1): 73-82.
- Levin ED, Bencan Z, Cerutti DT. 2007. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol Behav* 90: 54-58.
- Linney E, Upchurch L, Donerly S. 2004. Zebrafish as a neurotoxicological model. *Neurotoxicol. Teratol.* 26: 709-718.
- Martinez-Finley EJ, Ali AM, Allan AM. 2009. Learning deficits in C57BL/6J mice following perinatal arsenic exposure: consequence of lower corticosterone receptor levels? *Pharmacol Biochem Behav* 94(2):271-7.
- Nagaraja TN, Desiraju T. 1993. Effects of chronic consumption of metanil yellow by developing and adult rats on brain regional levels of noradrenaline, dopamine and serotonin, on acetylcholine esterase activity and on operant conditioning. *Food Chem Toxicol* 31(1):41-4.
- Nickson R, McArthur J, Burgess W, Ahmed KM, Ravenscroft P, Rahman M. 1998. Arsenic poisoning of Bangladesh groundwater. *Nature* 395(6700): 338.
- Pryor GT, Uyeno ET, Tilson HA, Mitchell CL. 1983. Assessment of chemicals using a battery of neurobehavioral tests: a comparative study. *Neurobehav Toxicol Teratol.* 5(1):91-117.

- Ralevic V, Burnstock G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50(3):413-92.
- Ramanathan K, Shila S, Kumaran S, Panneerselvam C. 2003. Ascorbic acid and alpha-tocopherol as potent modulators on arsenic induced toxicity in mitochondria. *J Nutr Biochem* 14(7):416-20.
- Ramirez OA, García FP. 2005. Genotoxic damage in zebra fish (*Danio rerio*) by arsenic in waters from Zimapan, Hidalgo, Mexico. *Mutagenesis*. 20(4):291-5.
- Rico EP, Senger MR, Fauth MG, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. 2003. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci*. 73:2071–2082.
- Rico EP, Rosemberg DB, Senger MR, Arizi Mde B, Bernardi GF, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. 2006. Methanol alters ecto-nucleotidases and acetylcholinesterase in zebrafish brain. *Neurotoxicol Teratol*. 28(4):489-96.
- Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*. 2: 409–430.
- Rodríguez VM, Carrizales L, Jiménez-Capdeville ME, Dufour L, Giordano M. 2001. The effects of sodium arsenite exposure on behavioral parameters in the rat. *Brain Res Bull* 55(2):301-8.
- Rodríguez VM, Carrizales L, Mendoza MS, Fajardo OR, Giordano M. 2002. Effects of sodium arsenite exposure on development and behavior in the rat. *Neurotoxicol Teratol*. 24(6):743-50.
- Rodríguez VM, Jiménez-Capdeville ME, Giordano M. 2003. The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicol Lett*. 145(1):1-18.

- Rosemberg DB, Rico EP, Senger MR, Arizi MB, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. 2007. Acute and subchronic copper treatments alter extracellular nucleotide hydrolysis in zebrafish brain membranes. *Toxicology* 236(1- 2) 132-139.
- Senger MR, Rico EP, Dias, RD, Bogo MR, Bonan CD. 2004. Ecto-5'-nucleotidase activity in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol* 139(2):203–207.
- Senger MR, Rico EP, de Bem Arizi M, Rosemberg DB, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. 2005. Carbofuran and malathion inhibit nucleotide hydrolysis in zebrafish (*Danio rerio*) brain membranes. *Toxicology*. 212(2-3):107-15.
- Senger MR, Rico EP, De Bem Arizi M, Frazzon AP, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. 2006. Exposure to Hg²⁺ and Pb²⁺ changes NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in central nervous system of zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology* 226(2-3):229-37.
- Shi H, Hudson LG, Ding W, Wang S, Cooper KL, Liu S, Chen Y, Shi X, Liu KJ. 2004. Arsenite causes DNA damage in keratinocytes via generation of hydroxyl radicals. *Chem Res Toxicol* 17(7):871-8.
- Stern HM, Zon LI. 2003. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nature Rev Cancer*. 3:1-7.
- Stummeyer J, Harazim B, Wippermann T. 1996. Speciation of arsenic in water samples by high-performance liquid chromatography-hydride generation-atomic absorption spectrometry at trace levels using a post-column reaction system. *Anal Bioanal Chem* 354(3):344-351.
- Taylor JS, Raes J. 2004. Duplication and divergence: the evolution of new genes and old ideas. *Annu Rev Genet*. 38:615-43.
- Tseng CH. 2004. The potential biological mechanisms of arsenic-induced diabetes mellitus. *Toxicol Appl Pharmacol* 197(2):67-83.

- Vahidnia A, van der Voet GB, de Wolff FA. 2007. Arsenic neurotoxicity--a review. *Hum Exp Toxicol* 26(10):823-32.
- Ventura-Lima J, de Castro MR, Acosta D, Fattorini D, Regoli F, de Carvalho LM,Bohrer D, Geracitano LA, Barros DM, Marins LF, da Silva RS, Bonan CD, Bogo MR..Monserrat JM. 2009.Effects of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gill of the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 149(4):538-43.
- Vogel G. 2000. Genomics. Sanger will sequence zebrafish genome. *Science.* 290: 1671.
- Wang CM, Chang YY, Sun SH. 2003. Activation of P2X7 purinoceptor-stimulated TGF-beta 1 mRNA expression involves PKC/MAPK signalling pathway in a rat brain-derived type-2 astrocyte cell line, RBA-2, *Cell Signal.* 15(12): 1129-1137.
- Zimmermann H. 2001. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* 52: 44-56.

LEGEND OF FIGURES

Fig. 1: Effect of different arsenic concentrations (0.05 mg/L, 5 mg/L, and 15 mg/L) after a 96 h-exposure on number of line crossings (A), distance traveled (B), mean speed (C), absolute turn angle (D), time in upper zone (E), time in middle zone (F), time in lower zone (G) during 5 minutes of videorecording. Data are presented as mean \pm S.E.M (n=10 per group). Data were statistically analyzed by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post-hoc test. * $p < 0.05$ denotes a significant difference from control group.

Fig. 2: Effect of different arsenic concentrations (0.05 mg/L, 5 mg/L, and 15 mg/L) after 96 h-exposure on ATP (A), ADP (B), and AMP (C) hydrolysis in zebrafish brain membranes. Data are presented as mean \pm S.D. (n=10 per group) and were statistically analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey as post hoc . * represents $P < 0.05$ as significant different from control group.

FIGURE 1

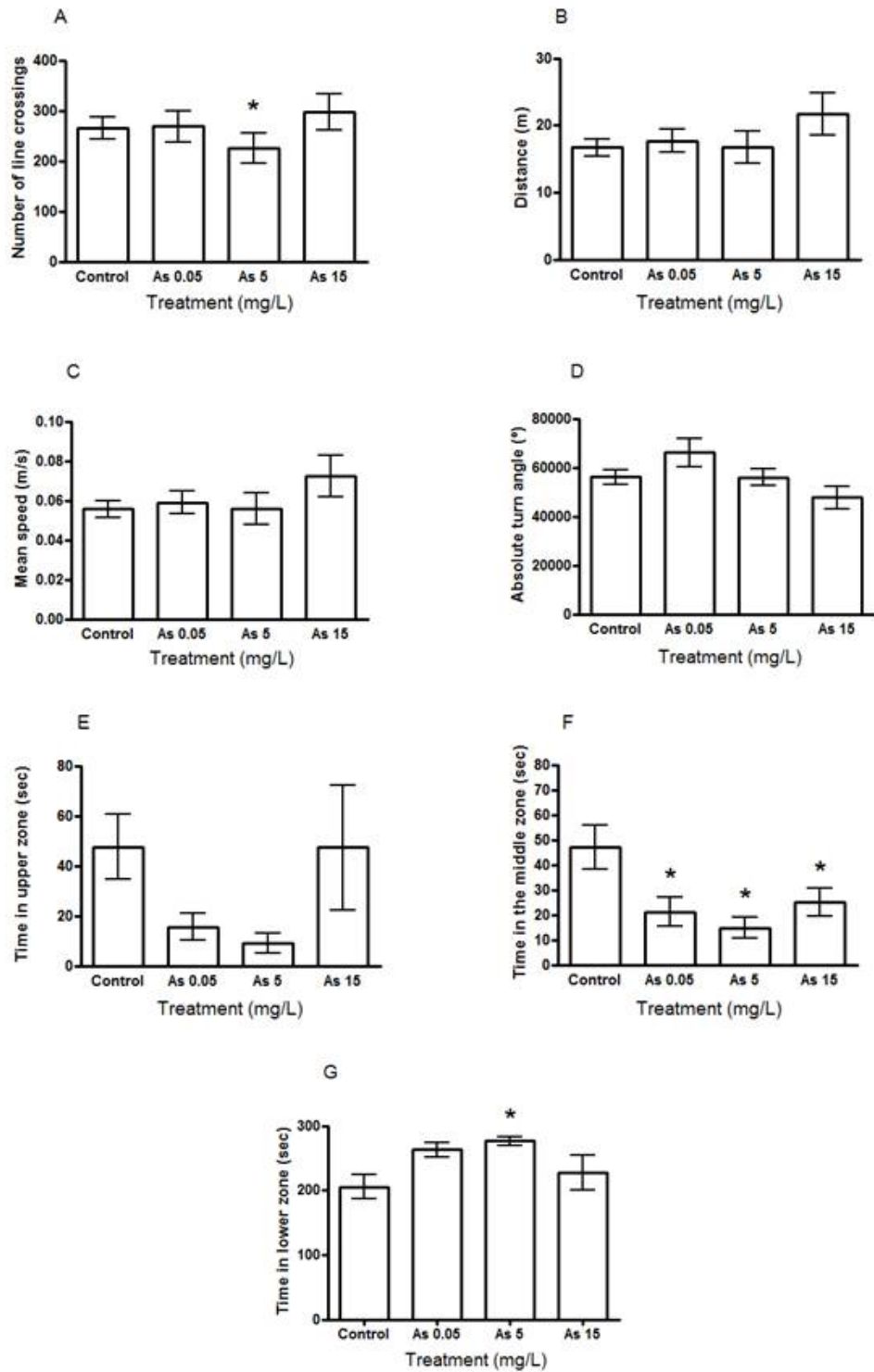
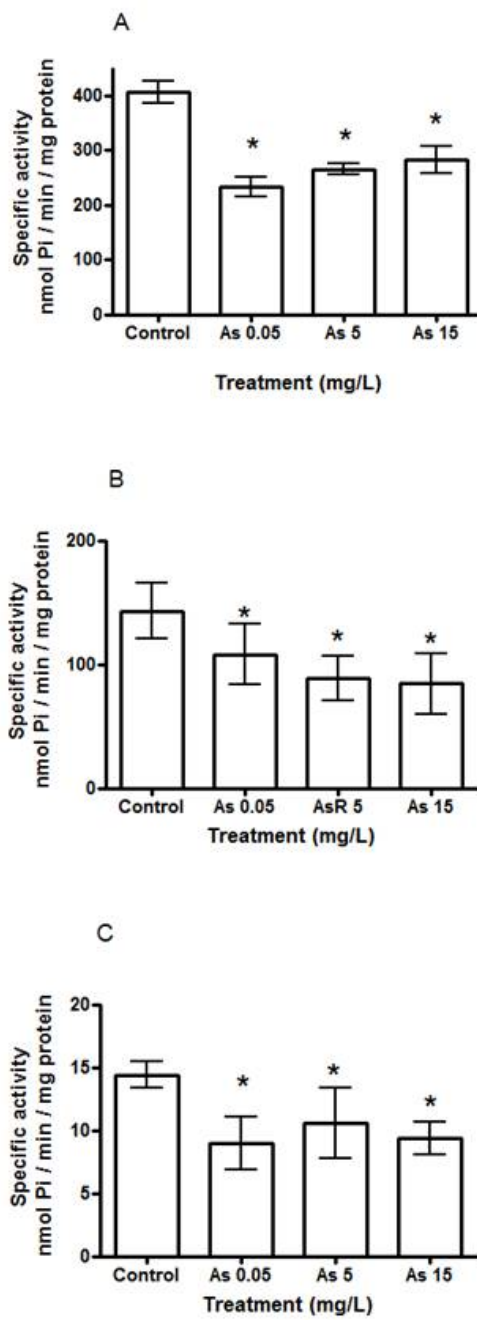


FIGURE 2



CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A contaminação com arsênio pode ocorrer de varias maneiras, dentre elas a exposição oral ao arsênio, que ocorre principalmente através de alimentos contaminados, como por exemplo, espécies de arsênio encontradas em peixes e frutos do mar (EDMONDS E FRANCESCONI, 1987; FOA et al., 1984; SCHÄFER et al., 1999; YAMAUCHI et al., 1992). Esta forma de contaminação geralmente está relacionada ao rim, fígado e câncer de pele, enquanto a exposição por inalação (outra maneira de intoxicação por arsênio) tem sido associada aos pulmões, provocando efeitos carcinogênicos. A exposição ao arsênio também está associada com o desenvolvimento de doenças como, neuropatia periférica e distúrbios vasculares periféricos, tais como a doença Blackfoot, uma doença que resulta em gangrena dos membros inferiores (CHEN E WANG, 1990; EPA, 1984; YU, 1999). A contaminação por inalação ocorre também através da exposição a pesticidas agrícolas ou em atividades da mineração e fundição (BOLLA-WILSON E BLEECKER, 1987; GOERING et al., 1999, GOYER, 1991; SCHÄFER et al., 1999).

Segundo a literatura atual, o arsênio tem uma tendência a alterar a atividade locomotora. Em estudos com ratos expostos a trióxido de arsênico, por 14 dias foi analisada uma resposta bifásica na atividade locomotora. A baixa dose de trióxido de arsênico (3 mg/kg) aumentou a atividade locomotora, e uma dose elevada (10 mg /kg) diminuiu a atividade locomotora (ITOH et al., 1990). PRYOR et al. (1983) relataram uma diminuição na atividade locomotora de ratos expostos a trióxido de arsênico em doses de 1,5, 3,0 6,0 e 12 mg/kg. Este efeito desapareceu 3 semanas após a interrupção da administração. Ratos expostos ao arsenito de sódio nas doses de 10 e 20 mg/kg durante 15 ou 30 dias mostraram redução na atividade locomotora, a qual desapareceu após cessar a exposição ao arsênio (RODRIGUEZ et al., 2001). Em ratos, a alteração mais consistente no comportamento é uma diminuição na atividade locomotora após a administração de arsênio, trióxido de

arsênico, arseniato de sódio ou de arsenito de sódio (RODRIGUEZ et al., 1998, 2001; NAGARAJA E DESIRAJU, 1993).

No capítulo 2, analisamos que o arsênio é capaz de promover mudanças significativas nos parâmetros comportamentais relacionados à atividade locomotora e ansiedade, o que está de acordo com os dados da literatura referentes aos efeitos do arsênio sobre parâmetros comportamentais. Após 96 horas de exposição a diferentes concentrações de arsênio, houve uma diminuição no número de cruzamentos no aquário. Além disso, os animais submetidos à exposição ao arsênio diminuíram o tempo de permanência na zona média e aumentaram o tempo de permanência na zona inferior do aquário, sugerindo um efeito ansiogênico do arsênio. De acordo com a figura 1A, observamos uma redução significativa de 30,5 % no número de cruzamentos no grupo tratado com 5 mg/L de arsênio em relação ao grupo controle. Portanto, o arsênio induziu alterações na atividade locomotora e promoveu um efeito ansiogênico.

Considerando que o sistema purinérgico pode estar envolvido no controle destes fatores (EL YACOUBI et al., 2000), o presente estudo demonstrou os efeitos do arsênio sobre as atividades das ectonucleotidases, enzimas que são responsáveis pelo efetivo controle dos níveis de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares. Nossos resultados demonstraram que o arsênio é capaz de alterar as atividades das ectonucleotidases em membranas cerebrais de peixe zebra. Foi possível observar uma redução significativa da hidrólise de ATP e ADP em todas as concentrações de arsênio após tratamento subcrônico de 96 horas. A hidrólise do AMP também foi inibida significativamente em todas as concentrações testadas de arsênio nas mesmas condições. As ectonucleotidases são importantes em condições fisiológicas e também patológicas, pois participam de um processo de inativação do sinal do ATP através de uma cascata de reações, gerando ADP, AMP

e adenosina. Portanto, alterações no funcionamento desta cascata, gerando acúmulo nos níveis de ATP podem induzir a um efeito neurotóxico (KATO et al., 2004).

Diversos estudos demonstraram que os metais podem promover efeitos tóxicos em diversos sistemas de neurotransmissão, tais como glutamatérgico (NIHEI & GUILARTE, 2001), gabaérgico (LASLEY & GILBERT, 2002), serotoninérgico (OUDAR et al., 1989), dopaminérgico (FARO et al., 2001) e colinérgico (MIRZOIAN & LUETJE, 2002). A literatura atual não apresenta dados sobre efeitos do arsênio no sistema purinérgico em modelos biológicos. Porém, estudos relatam os efeitos de arsenitos e arseniatos sobre o sistema colinérgico, onde se observou uma diminuição da atividade da acetilcolinesterase (AChE) em homogeneizados da fração axonal da medula espinhal de ratos expostos a 100 mg/L arsenito de sódio na água de beber durante 11 dias (VALKONEN et al., 1983). Em experimentos com arsenito (10^{-4} M) em fatias de cérebro de camundongos, houve uma participação do mesmo na inibição da síntese, liberação e recaptção da acetilcolina (ACh), resultando na diminuição da atividade da AChE (KOBAYASHI et al., 1987). O Arsênio atua no sistema colinérgico, através de interações com os grupos sulfidrilas, envolvidos nos mecanismos de captação de alta afinidade da colina, e com os grupos dissulfeto da AChE (RODRIGUEZ et al., 2003; TREVOR et al., 1978). Estudos demonstraram uma diminuição da atividade da AChE em ratos na concentração de 5 mg/kg arseniato de sódio 2 a 3 meses e nas concentrações de 25 a 100 mg/dL de arsenito de sódio em água potável por 4 meses (KANNAN et al., 2001; NAGARAJA & DESIRAJU, 1994; TRIPATHI et al., 1997).

Estudos demonstram que o arsênio também pode funcionar como um agente indutor de estresse oxidativo. Estudos constataram uma redução no consumo de oxigênio na exposição *in vivo* ao arsênio, porque o arsênio é um potente inibidor da

piruvato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase. Tais efeitos inibem o ciclo do ácido cítrico, prejudicando a formação das coenzimas de redução NADH e NADPH, ocasionando perda de produção de ATP e redução no consumo de oxigênio (RAMANATHAN et al, 2003; TSENG, 2004). Outras formas de arsênio como as espécies inorgânicas podem atuar afetando a NADH desidrogenase e o citocromo C. A diminuição na atividade destas enzimas resultaria na inibição do fluxo de elétrons do NADH/NADPH ao oxigênio, com isso poderia aumentar a produção de EROs e diminuir o consumo de oxigênio. Tais efeitos a longo prazo resultariam na redução da capacidade de síntese de ATP que pode prejudicar a síntese de glutatona, favorecendo um cenário de estresse oxidativo. Espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na toxicidade do arsênio, levando a danos oxidativos do DNA, proteínas e lipídios (BAU et al. 2002, SHI et al., 2004). Um recente estudo indica que o arsênio pode ser tóxico causando perturbações no sistema antioxidante, alterando as concentrações de glutatona e da glutamina cisteína ligase, favorecendo um cenário de estresse oxidativo (VENTURA-LIMA et al., 2009).

O peixe zebra possui importantes e favoráveis características para pesquisas, é capaz de absorver de forma rápida os compostos adicionados na água e acumulá-los em diferentes tecidos (YAMAZAKI et al., 2002; GOLDSMITH, 2004). Diferentes trabalhos com contaminantes ambientais utilizando este modelo biológico e envolvendo aspectos toxicológicos já foram desenvolvidos no sistema nervoso central de peixe zebra, dentre eles a TCDD (DONG et al., 2002; HILL et al., 2003), pesticidas carbamatos e organofosforados (SENGER et al., 2005), metanol (RICO et al., 2006) e metais pesados (SENGER et al., 2006; ROSEMBERG et al., 2007a), o que faz deste um importante modelo biológico para atuar como indicador de contaminação aquática.

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que as ectonucleotidases são enzimas sensíveis a ações promovidas pelo arsênio e que os parâmetros comportamentais também são alterados, sinalizando que o sistema purinérgico pode ser um alvo potencial para neurotoxicidade induzida pelo arsênio, causando ainda efeitos ansiogênicos e na atividade locomotora nesta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBRACCHIO MP, BURNSTOCK G, VERKHRATSKY A, ZIMMERMANN H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. . Epub 2008 Nov 12. Review. *Trends Neurosci.* 2009 Jan;32(1):19-29
- AGRANOFF BW, ALBERS RW, ALTEMUS M. Basic Neurochemistry molecular, cellular and medical aspects. Lippincott Williams & Wilkins, 6 Ed. 1999.
- AMATRUDA JF, SHEPARD JL, STERN HM, ZON LI. Zebrafish as a cancer model system. *Cancer Cell* 1: 229-231, 2002.
- AMSTERDAM A, NISSEN RM, SUN Z, SWINDELL EC, FARRINGTON S, HOPKINS N. et al. Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc. Natl Acad. Sci.* 101: 12792–12797, 2004.
- ANDERSON AC, ABDELGHANI AA, JAGHABIR M, MATHER F. Arsenic levels in blood, urine, and hair of workers applying monosodium methanearsonate (MSMA). *Arch Environ Health.* 41(3):163-169, 1986.
- ANDREW AS, BURGESS JL, MEZA MM, DEMIDENKO E, WAUGH MG, HAMILTON JW, KARAGAS MR. Arsenic exposure is associated with decreased DNA repair in vitro and in individuals exposed to drinking water arsenic. *Environ Health Perspect* 2006; **114**: 1193–9.
- ARENZANA FJ, CLEMENTE D, SANCHEZ-GONZALEZ R, PORTEROS A, AIJON J, AREVALO R. Development of the cholinergic system in the brain and retina of the zebrafish. *Brain Res. Bul.* 66: 421-425, 2005.
- ATCHINSON T, BRASKAMP L, MAEHR M. Staff productivity: the other side of cost cutting. Interview by Cheryl Tabatabai, *Healthc Financ Manage.* 41(5):42-4, 1987.
- BARBAZUK WB, KORF I, KADAVI C, HEYEN J, TATE S, WUN E, BEDELL JA, MCPHERSON JD, JOHNSON SL. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* 10:1351– 1358, 2000.
- BAU DT, Wang TS, Chung CH, Wang AS, Wang AS, Jan KY. Oxidative DNA adducts and DNA-protein cross-links are the major DNA lesions induced by arsenite. *Environ Health Perspect.* 2002 Oct;110 Suppl 5:753-6. Review.
- BEHRA M, COUSIN X, BERTRAND C, VONESCH JL, BIELMANN D, CHATONNET A, STRÄHLE U. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nat. Neurosci.* 5(2): 111-118, 2002.
- BIANCHI V, SPYCHALA J. Mammalian 5'-nucleotidases. *J. Biol. Chem.* 278(47): 46195-46198, 2003.
- BLAS, O. J. DE; GONZALEZ, S. V.; RODRIGUEZ, R. S.; MENDEZ, J. H.; Determination of zinc in serum, blood, and ultrafiltrate fluid from patients on hemofiltration by graphite furnace/atomic absorption spectroscopy or flow injection analysis/atomic absorption spectroscopy. *J. AOAC Int.* 77: 441, 1994.
- BOEHMLER W, PETKO J, WOLL M, FREY C, THISSE B, THISSE C, CANFIELD VA, LEVENSON R. Identification of zebrafish A2 adenosine receptors and expression in developing embryos. Epub 2008 Dec 3. *Gene Expr Patterns.* 2009 Mar;9(3):144-51.

- BOLLA-WILSON, K., BLEECKER, M.L., 1987. Neuropsychological impairment following inorganic arsenic exposure. *J. Occup. Med.* 29, 500–503.
- BROUGHTON RE, MILAN JE, ROE BA. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA. *Genome Res.* 11: 1958-1967, 2001.
- BURNSTOCK G. Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol.* 4:47-52, 2004.
- BURNSTOCK G. Pathophysiology and Therapeutic Potential of Purinergic Signaling. *Pharmacol Rev.* 58:58–86, 2006.
- BURNSTOCK G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87: 659–797, 2007.
- BURNSTOCK G. Purinergic cotransmission. *Brain Res Bull.* 50(5/6):355-357, 1999.
- BURNSTOCK G., Purinergic signalling and disorders of the central nervous system, *Nat. Rev., Drug Discov.* 7 (2008), pp. 575–590.
- BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G. E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Revue de Cytologie Clinique.* 240:231–304, 2004.
- CENTENO JA, MULLICK FG, MARTINEZ L, PAGE NP, GIBB H, LONGFELLOW D, THOMPSON C, AND LADICH ER. Pathology related to chronic arsenic exposure. *Environ Health Perspect.* 110: 883–886, 2002.
- CHATTERJEE A, SHIBATA Y, YOSHINAGA J, MORITA M. Determination of arsenic compounds by high performance liquid chromatography-ultrasonic nebulizer-high power nitrogen-microwave-induced plasma mass spectrometry an accepted coupling. *Anal Chem.* 72 (18):4402-4412, 2000.
- CHEN CJ, CHEN CW, WU MM, AND KUO TL. Cancer potential in liver, lung, bladder and kidney due to ingested inorganic arsenic in drinking water. *Br. J. Cancer* 66: 888–892, 1992.
- CHEN CJ, CHUANG YC, YOU SL, LIN TM, AND WU HY. A retrospective study on malignant neoplasms of bladder, lung and liver in blackfoot disease endemic area in Taiwan. *Br. J. Cancer* 53: 399–405, 1986.
- CHEN, C.J., WANG, C.J., 1990. Ecological correlation between arsenic level in well water and age-adjusted mortality from malignant neoplasms. *Cancer Res.* 50, 5470–5474.
- CLEMENTE D, PORTEROS A, WERUAGA E, ALONSO JR, ARENZANA FJ, AIJÓN J, ARÉVALO R. Cholinergic elements in the zebrafish central nervous system: Histochemical and immunohistochemical analysis. *J. Comp. Neurol.* Jun 14;474(1):75-107, 2004.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, resolução 20, 30/07/1996; www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html
- CROLLIUS RH, WEISSENBAACH J, Fish genomics and biology. *Genome Res.* 15(12):1675-82, 2005.
- CUNHA RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int.* 38(2): 107-25, 2001.

- DAHM R, GEISLER R, NUSSLEIN-VOLHARD C. Zebrafish (*Danio rerio*) genome and genetics. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, 2nd ed., pp 593–626, 2006.
- DAHM R. Atlas of embryonic stages of development in the zebrafish. *Zebrafish: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press, pp 219–236, 2002.
- DE CASTRO MR, LIMA JV, DE FREITAS DP, VALENTE RDE S, DUMMER NS, DE AGUIAR RB, DOS SANTOS LC, MARINS LF, GERACITANO LA, MONSERRAT JM, BARROS DM., Behavioral and neurotoxic effects of arsenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*, Teleostei: Cyprinidae).. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2009 Sep;150(3):337-42. Epub 2009 Jun 6.
- DEMESMAY C, OLLE M, PORTHAULT M, FRESENIUS. Arsenic speciation by coupling high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. Chem.* 348: 205, 1994.
- DI IORIO P, BALLERINI P, CACIAGLI F, CICCARELLI R. Purinoceptor-mediated modulation of purine and neurotransmitter release from nervous tissue. *Pharmacological Research* 37:169–178, 1998
- DIAZ-HERNANDEZ M, COX JA, MIGITA K, HAINES W, EGAN TM, VOIGT MM. Cloning and characterization of two novel zebrafish P2X receptor subunits. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 295 (4): 849-853, 2002.
- DONG W, TERAOKA H, YAMAZAKI K, TSUKIYAMA S, IMANI S, IMAGAWA T, STEGEMAN JJ, PETERSON RE, HIRAGA T. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in the zebrafish embryo: local circulation failure in the dorsal midbrain is associated with increased apoptosis. *Toxicol Sci.* 69(1):191-201, 2002.
- DONOVAN A, BROWNLIE A, ZHOU Y, SHEPARD J, PRATT SJ, MOVNIHAN J, PAW BH, DREJER A, BARUT B, ZAPATA A, LAW TC, BRUGNARA C, LUX SE, PINKUS GS, PINKUS JL, KINGSLEY PD, PALIS J, FLEMING MD, ANDREWS NC, ZON LI. Positional cloning of zebrafish ferroportin identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 403: 776–781, 2000.
- DOOLEY K, ZON LI. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr. Op. Genet. Dev.* 10: 252-256, 2000.
- DUNWIDDIE TV, MASINO SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 24:31-55, 2001.
- EDMONDS, J.S., FRANCESCONI, K.A.,. Transformations of arsenic in the marine environment. *Experientia* 43, 553–557, 1987.
- EDWARDS JG, MICHEL WC. Odor-Stimulated glutamatergic neurotransmission in the zebrafish olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 454 (3):294-309, 2002.
- EDWARDS JG, MICHEL WC. Pharmacological characterization of ionotropic glutamate receptors in the zebrafish olfactory bulb. *Neuroscience.* 122(4):1037-47, 2003.
- EGAN TM, COX JA, VOIGT MM. Molecular cloning and functional characterization of the zebrafish ATP-gated ionotropic receptor P2X3 subunit. *FEBS Lett.* 475: 287-290, 2000.
- EL YACOUBI M, LEDENT C, MENARD JF, PARMENTIER M, COSTENTIN J, VAUGEOIS JM. The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in

- mice are mediated through its blockade of adenosine A(2A) receptors. *Br. J. Pharmacol.* 129(7):1465-73, 2000.
- EPA, 1984. Health assessment document for inorganic arsenic (final report). EPA/600/8-83/021F. Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.
- FARBER SA, PACK M, HO SY, JOHNSON ID, WAGNER DS, DOSCH R, MULLINS MC, HENDRICKSON HS, HENDRICKSON EK. & HALPERN, M.E. Genetic analysis of digestive physiology using fluorescent phospholipids reporters. *Science* 292: 1385–1388, 2001.
- FARO LR, DO NASCIMENTO JL, ALFONSO M, DURÁN R., In vivo effects of inorganic mercury (HgCl₂) on striatal dopaminergic system. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2001 Mar;48(3):263-7.
- FERNANDES Y, GERLAI R. Long-term behavioral changes in response to early developmental exposure to ethanol in zebrafish. *Alcohol Clin Exp Res.* 33(4):601-9, 2009.
- FOA, V., COLOMBI, A., MARONI, M., BURATTI, M., CALZAFERRI, G., 1984. The speciation of the chemical forms of arsenic in the biological monitoring of exposure to inorganic arsenic. *Sci. Total Environ.* 34, 241–259.
- FREDDUZZI S, MORATALLA R, MONOPOLI A, CUELLAR B, XU K, ONGINI E, IMPAGNATIELLO F, SCHWARZSCHILD MA, CHEN JF. Persistent behavioral sensitization to chronic L-DOPA requires A2A adenosine receptors. *J. Neurosci.* 22(3):1054-62, 2002.
- FREDHOLM BB, IJZERMAN AP, JACOBSON KA, KLOTZ KN, LINDEN J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 53: 527-552, 2001.
- FREDHOLM BB. Adenosine and neuroprotection. *Int. Rev. Neurobiol.* 40:259-80, 1997.
- GARRITY DM, CHILDS S, AND FISHMAN MC. The heartstrings mutation in zebrafish causes heart/fin Tbx5 deficiency syndrome. *Development* 129: 4635–4645, 2002.
- GERLAI R, LAHAV M, GUO S, ROSENTHAL A. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 67: 773-782, 2000.
- GERLAI R, LEE V, BLASER R. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacol Biochem Behav.* 85(4):752-61, 2006.
- GERLAI R. Zebra fish: an uncharted behavior genetic model. *Behav. Genet.* 33(5):461-8, 2003.
- GERLAI R. Zebrafish antipredatory responses: A future for translational research? *Behav Brain Res.* 2009, no prelo
- GERULL B, GRAMLICH M, ATHERTON J, MCNABB M, TROMBITÁS K, SASSE-KLAASSEN S, SEIDMAN C, GRANZIER H, LABELIT S, FRENNEAUX M, THIERFELDER L. et al. Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. *Nature Genet.* 30: 201–204, 2002.
- GILMOUR DT, JESSEN JR, LIN S. Manipulating gene expression in the zebrafish, *Zebrafish: A Practical Approach*, pp 121–143, 2002.

- GOERING, P.L., APOSHIAN, H.V., MASS, M.J., CEBRIAN, M., BECK, B.D., WAALKES, M.P., The enigma of arsenic carcinogenesis: role of metabolism. *Toxicol. Sci.* 49, 5–14, 1999.
- GOLDSMITH P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4(5):504-12, 2004.
- GOYER, R.A., 1991. Toxic effects of metals. In: Doull, J., Klaassen, C.D., Amdur, M.O. (Eds.), *Toxicology*. Pergamon Press, New York, pp. 623–679.
- GREGORY M, JAGADEESWARAN P. Selective labeling of zebrafish thrombocytes: quantitation of thrombocytes function and deletion during development. *Blood Cell Mol Dis.* 29: 286-295, 2002.
- GUO S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish?. *Genes Brain Behav.* 3: 63-74, 2004.
- GUO S. Using zebrafish to assess the impact of drugs on neural development and function. *Expert Opin Drug Discov.* 4(7):715-726, 2009.
- HANNA, C. P.; TYSON, J. F.; MCINTOSH, S.; Determination of inorganic arsenic and its organic metabolites in urine by flow-injection hydride generation atomic absorption spectrometry. *Clin. Chem.* 39: 1662, 1993.
- HE W, GREENWELL RJ, BROOKS DM, CALDERON-GARCIDUENAS L, BEALL HD, COFFIN JD. Arsenic exposure in pregnant mice disrupts placental vasculogenesis and causes spontaneous abortion. *Toxicol Sci.* 2007;99(1):244–253
- HILL AJ, TERAOKA H, HEIDEMAN W, PETERSON RE. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci.* 86(1):6-19, 2005.
- HILL ET AL., 2008 D.S. HILL, B.J. WLODARCZYK AND R.H. FINNELL, Reproductive consequences of oral arsenate exposure during pregnancy in a mouse model, *Birth Defects Res. B: Dev. Reprod. Toxicol.* **83** (2008), pp. 40–47
- HILL RL, AND JANZ DM. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): I. Effects on sex ratio and breeding success. *Aquat. Toxicol.* 63: 417–429, 2003.
- HOLSON ET AL., 2000 J.F. HOLSON, D.G. STUMP, K.J. CLEVIDENCE, J.F. KNAPP AND C.H. FARR, Evaluation of the prenatal developmental toxicity of orally administered arsenic trioxide in rats, *Food Chem. Toxicol.* **38** (2000), pp. 459–466.
- HOWARD RJ, BURGESS GH. Surgical hazards posed by marine and freshwater animals in Florida. *Am. J. Surg.* 166(5):563-7, 1993.
- ILLES P, RIBEIRO JA. Molecular physiology of P2 receptor in the central nervous system. *Eur. J. Pharmacol.* 483: 5-17, 2004.
- ITOH T, ZHANG YF, MURAI S, SAITO H, NAGAHAMA H, MIYATE H, SAITO Y, ABE E. *Toxicol Lett.* The effect of arsenic trioxide on brain monoamine metabolism and locomotor activity of mice. Department of Pharmacology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, Japan 1990 Dec;54(2-3):345-53.
- KANNAN GM, TRIPATHI N, DUBE SN, GUPTA M, FLORA SJ. Toxic effects of arsenic (III) on some hematopoietic and central nervous system variables in rats and guinea pigs. Defense Research and Development Establishment, Gwalior, India, *J Toxicol Clin Toxicol.* 2001;39(7):675-82.

- KARLOVICH CA, JOHN RM, RAMIREZ L, STAINIER DY, MYERS RM. Characterization of the Huntington's disease (HD) gene homologue in the zebrafish *Danio rerio*. *Gene* 217:117– 125, 1998.
- KASLIN J, PANULA P. Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic system in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Comp. Neurol.* 440: 342-377, 2001.
- KATO F, KAWAMURA M, SHIGETOMI E, TANAKA J, INOUE K. ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: synaptic purinoceptors: the stage for ATP to play its "dual-role". *J Pharmacol Sci.* 2004 Feb;94(2):107-11. Review.
- KIM YJ, NAM RH, YOO YM, LEE CJ. Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci. Lett.* 355: 29-32, 2004.
- KLAASSEN CD, Watkins JB. *Handbook of Toxicology*, Chapter 23: "Toxic Effects of Metals", Mc Graw-Hill Interamericana, 2001.
- KOBAYASHI H, YUYAMA A, ISHIHARA M, MATSUSAKA N. 1987. Effects of arsenic on cholinergic parameters in brain in vitro. *Neuropharmacol* 26(12):1707-13.
- KOKEL D, BRYAN J, LAGNER C, WHITE R, CHEUNG CY, MATEUS R, HEALEY D, KIM S, WERDICH AA, HAGGARTY SJ, MACRAE CA, SHOICHET B, PETERSON RT. Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish. *Nat Chem Biol.* 2010, no prelo.
- KUCENAS S, LI Z, COX JA, EGAN TM, VOIGT MM. Molecular characterization of the zebrafish P2X receptor subunit gene family. *Neuroscience* 121: 935–945, 2003.
- KUNO N, KADOMATSU K, MURAMATSU T. Determination of the optimal time and dosage of all-trans retinoic acid for induction of murine exencephaly. *Teratology.* 60(2):63-7, 1999.
- KUROSAWA, K. EGASHIRA, M. TANI, M. JAHIRUDDIN, A.Z. MOSLEHUDDIN AND Z.M. RAHMAN, Groundwater–soil–crop relationship with respect to arsenic contamination in farming villages of Bangladesh—a preliminary study, *Environ. Pollut.* 156 (2008), pp. 563–565, 2008.
- LANGENAU DM, TRAVER D, FERNANDO AA, KUTOK JL, ASTER JC, KANKI JP, D'ANDREA AD, LOOK AT. Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. *Science* 299: 887–890, 2003.
- LARA DR, SOUZA DO. Modelo de hipofunção adenosinérgica para a esquizofrenia: interação entre os sistemas purinérgico, glutamatérgico e dopaminérgico. *Revista Psiquiatria Clinica*, 28(3):160-169, 2001.
- LASLEY SM, GILBERT ME. Rat hippocampal glutamate and GABA release exhibit biphasic effects as a function of chronic lead exposure level. *Toxicol Sci.* 2002 Mar;66(1):139-47.
- LATINI S, PEDATA F. Adenosine in the central nervous system: Release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem.* 79: 463–484, 2001.
- LELE Z., KRONE PH. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotech Adv.* 14: 57-72, 1996.

- LEVIN ED, CHEN E. Nicotinic involvement in memory function in zebrafish. *Neurobiol. Teratol.* 26: 731-735, 2004.
- LEVIN ED, REZVANI AH. Nicotinic interactions with antipsychotic drugs, models of schizophrenia and impacts on cognitive function. *Biochem Pharmacol.* 74(8):1182-91, 2007.
- LI D, LU C, WANG J, HU W, CAO Z, SUN D, XIA H, MA X. Developmental mechanisms of arsenite toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Aquat Toxicol.* 2009 Feb 19;91(3):229-37. Epub 2008 Nov 24.
- LI L. & DOWLING, J. E. A dominant form of inherited retinal degeneration caused by a non-photoreceptor cell-specific mutation. *Proc. Natl Acad. Sci.* 11645–11650 1997.
- LIESCHKE GJ, CURRIE PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* 8(5):353-67, 2007.
- LILLESAAAR C, TANNHÄUSER B, STIGLOHER C, KREMMER E, BALLY-CUIF L. The serotonergic phenotype is acquired by converging genetic mechanisms within the zebrafish central nervous system. *Dev Dyn.* 236(4):1072-1084, 2007.
- LONG Q, MENG A, WANG H, JESSEN JR, FARRELL MJ, LIN S. GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene. *Development.* 124 (20): 4105-4111, 1997.
- LU T, LIU J, LECLUYSE EL, ZHOU YS, CHENG ML, AND WAALKES MP., Application of cDNA microarray to the study of arsenic-induced liver diseases in the population of Guizhou, China. *Toxicol Sci* 59: 185–192 2001.
- MACHADO IC, MAIO FD, KIRA CS, CARVALHO MFH. Estudo da ocorrência dos metais pesados Pb, Cd, Hg, Cu, Zn na ostra de mangue *Crassostrea brasiliana* do estuário de Cacanéia-SP, Brasil. *Rev. Int. Adolfo Lutz.* 61(1); 13-18, 2002.
- MARTIN JS, RENSHAW SA. Using *in vivo* zebrafish models to understand the biochemical basis of neutrophilic respiratory disease, *Biochem Soc Trans.* 2009 Ago; 37 (Pt 4) :830-7.
- MATTINGLY CJ, HAMPTON TH, BROTHERS KM, GRIFFIN NE, PLANCHART A. Perturbation of defense pathways by low-dose arsenic exposure in zebrafish embryos. *Environ Health Perspect.* 2009 Jun;117(6):981-7. Epub 2009 Feb 22.
- MAZUMDER DN, DAS GUPTA J, SANTRA A, PAL A, GHOSE A, AND SARKAR S. Chronic arsenic toxicity in west Bengal—the worst calamity in the world. *J Indian Med Assoc* 96: 4–7, 1998.
- MIRZOIAN A, LUETJE CW. Modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by mercury. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Aug;302(2):560-7.
- MORETTO MB, LERMEN CL, MORSCH VM, BOHRER D, INEU RP, DA SILVA AC, BALZ D, SCHETINGER MR. Effect of subchronic treatment with mercury chloride on NTPDase, 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase from cerebral cortex of rats. *J Trace Elem Med Biol.* 2004;17(4):255-60.
- NAGARAJA TN, Desiraju T., Effects of chronic consumption of metanil yellow by developing and adult rats on brain regional levels of noradrenaline, dopamine and serotonin, on acetylcholine esterase activity and on operant conditioning. *Food Chem Toxicol.* 1993 Jan;31(1):41-4.

- NAGARAJA, T.N., DESIRAJU, T., 1994. Effects on operant learning and brain acetylcholine esterase activity in rats following chronic inorganic arsenic intake. *Hum. Exp. Toxicol.* 13, 353–356.
- NAYAK AS, LAGE CR, KIM CH. Effects of low concentrations of arsenic on the innate immune system of the zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol Sci* 98(1):118-124, 2007.
- NEMEC M.D., HOLSON J.F., FARR C.H. AND HOOD R.D., Developmental toxicity assessment of arsenic acid in mice and rabbits, *Reprod. Toxicol.* **12** (1998), pp. 647–658.
- NICE AJ, LUNG WS, RIEDEL GF. Modeling arsenic in the Patuxent Estuary. *Environ Sci Technol.* 42(13):4804-10, 2008.
- NIHEI MK, GUILARTE TR., Molecular changes in glutamatergic synapses induced by Pb²⁺: association with deficits of LTP and spatial learning. *Neurotoxicology*. 2001 Oct;22(5):635-43. Review.
- NINKOVIC J, BALLY-CUIF L. The zebrafish as model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. *Methods*, 39:262-274, 2006.
- NORTON WH, ROHR KB, Burnstock G. Embryonic expression of P2X₃ receptor encoding gene in zebrafish. *Mech. Dev.* 9: 149-152, 2000.
- OLIVEIRA EM, ROCHA JB, SARKIS JJ. In vitro and in vivo effects of HgCl₂ on synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from cerebral cortex of developing rats. *Arch Int Physiol Biochim Biophys.* 1994 Sep-Oct;102(5):251-4.
- OTTO EA, SCHERMER B, OBARA T, O'TOOLE JF, HILLER KS, MUELLER AM, RUF RG, HOEFELE J, BEEKMANN F, LANDAU D, FOREMAN JW, GOODSHIP JA, STRACHAN T, KISPERS A, WOLF MT, GAGNADOUX MF, NIVET H, ANTIGNAC C, WALZ G, DRUMMOND IA, BENZIG T, HILDEBRANDT F. et al. Mutations in INVS encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination. *Nature Genet.* 34: 413–420, 2003.
- ODAR P, CAILLARD L, FILLION G. In vitro effect of organic and inorganic mercury on the serotonergic system. *Pharmacol Toxicol.* 1989 Oct;65(4):245-8.
- PEARSON T, CURRIE AJ, ETHERINGTON LA, GADALLA AE, DAMIAN K, LLAUDET E, DALE N, FRENGUELLI BG. Plasticity of purine release during cerebral ischemia: clinical implications? *J. Cell. Mol. Med.* 7(4):362-375, 2003.
- PETROPULU, M. O.; VARSAMIS, J.; PARISSAKIS, G.; Speciation of arsenobetaine in marine organisms using a selective leaching/digestion procedure and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 337: 323, 1997.
- PORKKA-HEISKANEN T. Adenosine in sleep and wakefulness. *Ann Med.* 31(2):125-9, 1999.
- POSS KD, KEATING MT. & NECHIPORUK A. Tales of regeneration in zebrafish. *Dev. Dyn.* 226: 202–210, 2003.
- POSTLETHWAIT JH, WOODS IG, NGO-HAZELETT P, YAN YL., KELLY PD, CHU F, HUANG H, HILL-FORCE A, AND TALBOT WS. Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. *Genome Res.* 10: 1890–1902, 2000.

- PRYOR GT, UYENO ET, TILSON HA, MITCHELL CL., Assessment of chemicals using a battery of neurobehavioral tests: a comparative study. *Neurobehav Toxicol Teratol.* 1983 Jan-Feb;5(1):91-117.
- RALEVIC V, BURNSTOCK G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 50(3):413-92, 1998.
- RAMANATHAN K, SHILA S, KUMARAN S, PANNEERSELVAM C. Ascorbic acid and alpha-tocopherol as potent modulators on arsenic induced toxicity in mitochondria. *J Nutr Biochem.* 2003 Jul;14(7):416-20.
- RIBEIRO JA, LOBO MG, SEBASTIÃO AM. Endogenous adenosine modulation of ²²Na uptake by rat brain synaptosomes. *Neurochem Res.* 2003 Oct;28(10):1591-5.
- RIBEIRO JA, SEBASTIAO AM, MENDONCA A. Participation of adenosine receptors in neuroprotection. *Drug News Perspect.* 16(2):80-6, 2003.
- RICKLEFS RE. *A economia da Natureza.* Editora Guanabara Koogan S.A, 1996.
- RICO EP, ROSEMBERG DB, SENGER MR, ARIZI MB, BERNARDI GF, DIAS RD, BOGO MR, BONAN CD. Methanol alters ectonucleotidases and acetylcholinesterase in zebrafish brain. *Neurotox Teratol.* 28:489–496, 2006.
- RICO EP, SENGER MR, FAUTH MG, DIAS RD, BOGO MR, BONAN CD. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci.* 73:2071–2082, 2003.
- ROBSON SC, SÉVIGNY J, ZIMMERMANN H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.* 2:409–430, 2006.
- RODRÍGUEZ VM, CARRIZALES L, JIMÉNEZ-CAPDEVILLE ME, DUFOUR L, GIORDANO M., The effects of sodium arsenite exposure on behavioral parameters in the rat. *Brain Res Bull.* 2001 May 15;55(2):301-8.
- RODRÍGUEZ VM, CARRIZALES L, MENDOZA MS, FAJARDO OR, GIORDANO M., Effects of sodium arsenite exposure on development and behavior in the rat.. *Neurotoxicol Teratol.* 2002 Nov-Dec;24(6):743-50.
- RODRÍGUEZ VM, Jiménez-Capdeville ME, Giordano M., The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicol Lett.* 2003 Nov 1;145(1):1-18. Review.
- RODRIGUEZ, V.M., DUFOUR, L., CARRIZALES, L., DIAZ-BARRIGA, F., JIMENEZ-CAPDEVILLE, M.E., 1998. Effects of oral exposure to mining waste on in vivo dopamine release from rat striatum. *Environ. Health Perspect.* 106, 487–491.
- ROSEMBERG DB, RICO EP, SENGER MR, ARIZI MB, DIAS RD, BOGO MR, BONAN CD. Acute and subchronic copper treatments alter extracellular nucleotide hydrolysis in zebrafish brain membranes. *Toxicology* 236: 132-139, 2007a.
- RYU S, HOLZSCHUH J, MAHLER J, DRIEVER W. Genetic analysis of dopaminergic system development in zebrafish. *J Neural Transm Suppl.* (70):61-6, 2006.
- SARKIS JJ, SALTO C. Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Brain Res Bull.* 1991 Jun;26(6):871-6.

- SCHÄFER, S.G., DAWES, R.L.F., ELSENHAN, B., FORTH, W., SCHÜMANN, K., 1999. Metals. In: Marquardt, H., Schäfer, S.G., McClellan, R.O. (Eds.), Toxicology. Academic Press, San Diego, CA, pp. 755–790.
- SCHERER U, FUCHS S, BEHRENDT H, HILLENBRAND T. Emissions of heavy metals into river basins of germany. *Water Sci. Technol.* 47 (7-8): 251-7, 2003.
- SCHETINGER MR, VIEIRA VL, MORSCH VM, BALZ D. ATP and ADP hydrolysis in fish, chicken and rat synaptosomes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2001 Apr;128(4):731-41.
- SCHNURSTEIN A, BRAUNBECK T. Tail moment versus tail length--application of an in vitro version of the comet assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol Environ Saf* 49: 187–196, 2001.
- SEIBT KJ, OLIVEIRA RDA L, RICO EP, DIAS RD, BOGO MR, BONAN CD., Antipsychotic drugs inhibit nucleotide hydrolysis in zebrafish (*Danio rerio*) brain membranes. *Toxicol In Vitro.* 2009 Feb;23(1):78-82. Epub 2008 Nov 1
- SENGER MR, RICO EP, DIAS, RD, BOBO MR, BONAN CD. Ecto-5'-nucleotidase activity in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem Physiol* 139(2):203–207, 2004.
- SENGER MR, RICO EP, DE BEM ARIZI M, FRAZZON AP, DIAS RD, BOGO MR, BONAN CD. Exposure to Hg²⁺ and Pb²⁺ changes NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in central nervous system of zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology* 226(2-3):229-37, 2006.
- SENGER, MR., RICO EP., DE BEM ARIZI M, ROSEMBERG DB., DIAS RD, BOGO MR, BONAN CD. Carbofuran and malathion inhibit nucleotide hydrolysis in zebrafish (*Danio rerio*) brain membranes. *Toxicology* 212, 107-115, 2005.
- SEOK SH, BAEK MW, LEE HY, KIM DJ, NA YR, NOH KJ, PARK SH, LEE HK, LEE BH, RYU DY, PARK JH. Arsenite-induced apoptosis is prevented by antioxidants in zebrafish liver cell line. *Toxicol In Vitro* 21(5):870-877, 2007.
- SHI H, HUDSON LG, DING W, WANG S, COOPER KL, LIU S, CHEN Y, SHI X, LIU KJ., Arsenite causes DNA damage in keratinocytes via generation of hydroxyl radicals. *Chem Res Toxicol.* 2004 Jul;17(7):871-8.
- SISON M, GERLAI R. Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*) in the plus maze. *Behav Brain Res.* 207(1):99-104, 2010.
- SLOMAN KA, SCOTT GR, DIAO Z, ROULEAU C, WOOD CM, MCDONALD DG. Cadmium affects the social behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Toxicol.* 65: 171-185, 2003.
- SMITH ET AL., 2008 E. SMITH, A.L. JUHASZ, J. WEBER AND R. NAIDU, Arsenic uptake and speciation in rice plants grown under greenhouse conditions with arsenic contaminated irrigation water, *Sci. Total Environ.* **392** (2008), pp. 277–283.
- SPRAGUE J, CLEMENTS D, CONLIN T, EDWARDS P, FRAZER K, SCHAPER K, SEGERDELL E, SONG P, SPRUNGER B, WESTERFIELD M. The Zebrafish Information Network (ZFIN): the zebrafish model organism database. *Nucleic. Acid. Res.* 31: 241-243, 2003.

- SPRAGUE J, DOERRY E, DOUGLAS S, WESTERFIELD M. The Zebrafish Information Network (ZFIN): a resource for genetic, genomic and developmental research. *Nucleic Acids Res.* 29 (1): 87-90, 2001.
- STERN HM, MURPHEY RD, SHEPARD JL, AMATRUDA JF, STRAUB CT, PFAFF KL, WEBER G, TALLARICO JA, KING RW, ZON LI. Small molecules that delay S phase suppress a zebrafish bmyb mutant. *Nat. Chem. Biol.* 1(7):366-70, 2005.
- STREISINGER, G., WALKER, C., DOWER, N., KNAUBER, D. SINGER, F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291: 293–296, 1981.
- STUMMEYER J, HARAZIM B, WIPPERMANN T. Speciation of arsenic in water samples by high-performance liquid chromatography-hydride generation-atomic absorption spectrometry at trace levels using a post-column reaction system. *Anal Bioanal Chem.* 354(3):344-351, 1996.
- TABACOVA, S., HUNTER III, E.S., GLADEN, B.C., 1996. Developmental toxicity of inorganic arsenic in whole embryo culture: oxidation state, dose, time, and gestational age dependence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 138, 298–307.
- TAYLOR JS, BRAASCH I, FRICKEY T, MEYER A, VAN DE PEER Y. Genome duplication, a trait shared by 22000 species of ray-finned fish. *Genome Res.* 13(3):382-90, 2003.
- TAYLOR JS, RAES J. Duplication and divergence: the evolution of new genes and old ideas. *Annu. Rev. Genet.* 38:615-43, 2004.
- TCHOUNWOU PB, PATLOLLA AK, AND CENTENO JA. Carcinogenic and systemic health effects associated with arsenic exposure—a critical review. *Toxicol Pathol* 31: 575–388, 2003.
- TREVOR, A.J., GORDON, M.A., PARKER, K.K., CHAN, S.L., 1978. Acetylcholinesterases. *Life Sci.* 23, 1209–1220.
- TRIPATHI, N., KANNAN, G.M., PANT, B.P., JAISWAL, D.K., MALHOTRA, P.R., FLORA, S.J., 1997. Arsenic-induced changes in certain neurotransmitter levels and their recoveries following chelation in rat whole brain. *Toxicol. Lett.* 92, 201–208.
- TSENG CH., The potential biological mechanisms of arsenic-induced diabetes mellitus. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004 Jun 1;197(2):67-83. Review.
- TSUDA M., KUBOYAMA K., INOUE T., NAGATA K., TOZAKI-SAITOH H. AND INOUE K., Behavioral phenotypes of mice lacking purinergic P2X4 receptors in acute and chronic pain assays, *Mol. Pain* 5 (2009), p. 28.
- VALKONEN, S., SAVOLAINEN, H., JARVISALO, J., 1983. Arsenic distribution and neurochemical effects in peroral sodium arsenite exposure of rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 30, 303–308.
- VASCOTTO SG, BECKHAM Y, KELLY GM. The zebrafish swim to fame as an experimental model in biology. *Biochem. Cell. Biol.* 75 (5), 479-485, 1997.
- VENTURA-LIMA J, DE CASTRO MR, ACOSTA D, FATTORINI D, REGOLI F, DE CARVALHO LM, BOHRER D, GERACITANO LA, BARROS DM, MARINS LF, DA SILVA RS, BONAN CD, BOGO MR, MONSERRAT JM. Effects of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gills of the zebrafish *Danio rerio*

- (Cyprinidae). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2009 May;149(4):538-43. Epub 2008 Dec 16.
- VIANNA EPM, FERREIRA AT, DONA F, CAVALHEIRO EA, FERNANDES MJ. Modulation of seizures and synaptic plasticity by adenosinergic receptors in an experimental model of temporal lobe epilepsy induced by pilocarpine in rats. *Epilepsia*. 46(5):166-173, 2005.
- VOGEL PD, NETT JH, SAUER HE, SCHMADEL K, CROSS RL, TROMMER WE. Nucleotide binding sites on mitochondrial F1-ATPase. Electron spin resonance spectroscopy and photolabeling by azido-spin-labeled adenine nucleotides support an adenylate kinase-like orientation. *J Biol Chem*. 1992 Jun 15;267(17):11982-6.
- VOGEL G. Genomics. Sanger will sequence zebrafish genome. *Science*. 290: 1671, 2000.
- VOLKNANDT W, VOGEL M, PEVSNER J, MISUMI Y, IKEHARA Y, ZIMMERMANN H. 5'-nucleotidase from the electric ray electric lobe. Primary structure and relation to mammalian and procaryotic enzymes. *Eur J Biochem*. 1991 Dec 18;202(3):855-61
- WAALKES MP, WARD JM, LIU J, AND DIWAN BA. Transplacental carci-nogenicity of inorganic arsenic in the drinking water: induction of hepatic, ovarian, pulmonary, and adrenal tumors in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*186: 7–17, 2003.
- WESTERFIELD M. *The zebrafish Book: A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. Eugene, 2000.
- WOODS IG, KELLY PD, CHU F, NGO-HAZELETT P, YAN YL, HUANG H, POSTLETHWAIT JH, AND TALBOT WS. A comparative map of the zebrafish genome. *Genome Res*. 10: 1903–1914, 2000.
- WU J, ZOU Y, ZHAN X, CHEN S, LU G, LAI F. Survey of heavy metal pollution in four chinese crude drugs and their cultivated soils. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2008 Dec;81(6):571-3. Epub 2008 Oct 7.
- XIE Y, LIU J, BENBRAHIM-TALLAA L, WARD JM, LOGSDON D, DIWAN BA, et al. Aberrant DNA methylation and gene expression in livers of newborn mice transplacentally exposed to a hepatocarcinogenic dose of inorganic arsenic. *Toxicology*. 2007;236(1–2):7–15.
- XIE Y, TROUBA KJ, LIU J, WAALKES MP, AND GERMOLEC DR. Biokinetics and subchronic toxic effects of oral arsenite, arsenate, monomethylarsonic acid, and dimethylarsinic acid in v-Ha-ras transgenic (Tg.AC) mice. *Environ Health Perspect*. 112: 1255–1263, 2004.
- YAMAUCHI, H., TAKAHASHI, K., MASHIKO, M., SAITOH, J., YAMAMURA, Y., 1992. Intake of different chemical species of dietary arsenic by Japanese, and their blood and urinary arsenic levels. *Appl. Organomet. Chem*. 6, 383–388.
- YAMAZAKI K, TERAOKA H, DONG W, STEGEMAN JJ, HIRAGA T. cDNA cloning and Expressions of cytochrome P450 1A in zebrafish embryos. *J. Vet. Med. Sci*. 64: 829-833, 2002.
- YU, D., 1999. A physiologically based pharmacokinetic model of inorganic arsenic. *Regul. Toxicol. Pharmacol*. 29, 128–141.

- ZIMMERMANN H. Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 49:589-618, 1996.
- ZIMMERMANN H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* 52: 44-56, 2001.
- ZIMMERMANN H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Arch Pharmacol.* 362:299-309, 2000.
- ZON LI, PETERSON R.T., *In vivo* drug discovery in the zebrafish. *Nat. Rev. Drug. Discov.* Jan; 4(1):35-44, 2005.

ANEXOS

De: onbehalfof+paul.b.tchounwou+jsums.edu@manuscriptcentral.com em nome de paul.b.tchounwou@jsums.edu

Enviada: sáb 27/2/2010 16:40

Para: Carla Denise Bonan

Assunto: TOX-10-063 successfully submitted

27-Feb-2010

Dear Dr. Bonan,

Your manuscript entitled "Arsenic alters ectonucleotidase activities and behavioral parameters in zebrafish (*Danio rerio*)" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Environmental Toxicology.

Your manuscript number is TOX-10-063. Please mention this number in all future correspondence regarding this submission.

You can view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging into <http://mc.manuscriptcentral.com/tox> . If you have difficulty using this site, please click the 'Get Help Now' link at the top right corner of the site.

Thank you for submitting your manuscript to Environmental Toxicology.

Sincerely,
Environmental Toxicology Editorial Office