

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

STEFANI ALTENHOFEN

**ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS PURINÉRGICO, COLINÉRGICO E
DOPAMINÉRGICO NA NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR METAIS E
AGROTÓXICOS EM PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

Orientadora: Prof. Dra. Carla Denise Bonan

PORTO ALEGRE – RS

Maio, 2017

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

STEFANI ALTENHOFEN

**ENVOLVIMENTO DOS SISTEMAS PURINÉRGICO, COLINÉRGICO E
DOPAMINÉRGICO NA NEUROTOXICIDADE INDUZIDA POR METAIS E
AGROTÓXICOS EM PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

Orientadora: Prof. Dra. Carla Denise Bonan

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

PORTO ALEGRE – RS

Maio, 2017

À minha família, meus eternos incentivadores.

Ao meu grande colega e amigo Cassiano Lazarotto Rambo.

“Para nós os grandes homens não são aqueles que resolveram os problemas, mas aqueles que os descobriram.”

Albert Schweitzer

RESUMO

Agentes neurotóxicos, tais como pesticidas, solventes orgânicos e metais, são capazes de alterar a atividade normal do Sistema Nervoso Central (SNC). O manganês (Mn) é um metal encontrado no ambiente que, quando em excesso, acumula-se no SNC, tornando-se um perigo potencial para a saúde. Além do Mn, outros agentes neurotóxicos podem causar alterações, levando a déficits em sistemas de neurotransmissão. O crescimento de pragas de lavoura tem aumentado exponencialmente o uso de agrotóxicos para manutenção de plantações. O fungicida tebuconazol é um triazol utilizado em culturas como a cevada, trigo, amendoim e frutas do pomar e relacionado com alterações comportamentais e oxidativas. O inseticida diclorvos, pertence a família dos organofosforados atuando através da inibição da acetilcolinesterase (AChE), que leva à hiperestimulação dos receptores colinérgicos. O sistema colinérgico é caracterizado pela ação da acetilcolina (ACh) nos receptores muscarínicos e nicotínicos. O nível dessa molécula é regulado pela acetilcolinesterase (AChE), que catalisa a degradação da ACh em colina e acetato. O sistema purinérgico é caracterizado pela ação do ATP e adenosina (ADO) nos purinoreceptores P2 e P1, respectivamente. Os níveis dessas moléculas são regulados pela ação das ectonucleotidases que catalisam a hidrólise do ATP a adenosina (ADO). A ADO pode ser desaminada a inosina (INO) pela ação da adenosina desaminase (ADA). A dopamina (DA), sintetizada a partir da L-DOPA, é o neurotransmissor do sistema dopaminérgico e age através dos seus receptores D₁-D₅, controlando o início e execução do movimento. Portanto, este estudo visa avaliar os efeitos da exposição ao manganês e agrotóxicos, tais como diclorvos e tebuconazol, sobre parâmetros comportamentais em peixe-zebra nos estágios larval e adulto, bem como os seus efeitos sobre a sinalização purinérgica, colinérgica e dopaminérgica. A exposição ao MnCl₂ nos estágios iniciais de desenvolvimento (1 hpf - 5 dpf) foi capaz de reduzir a distância percorrida, o ângulo de giro absoluto e o tempo de mobilidade das larvas aos 5, 7 e 10 dpf. Além disso, causou um aumento nos níveis de TH aos 5 e 7 dpf, seguido por uma redução em 10 dpf. Também foi observado um aumento dos marcadores de morte celular. Em animais adultos, a exposição ao longo de 96 horas causou redução na distância percorrida, número de cruzamentos e ângulo de giro absoluto, e ainda uma redução na aquisição de memória através da tarefa de esquiva inibitória. Além disso, os animais adultos expostos a MnCl₂ apresentaram aumento nos níveis de marcadores de morte celular, além de TH e DOPAC (ácido 3,4-di-hidroxifenilacético) no encéfalo. A exposição por 96 horas a este metal também foi capaz de inibir a atividade das NTPDases e da ecto-ADA e reduzir os transcritos de RNAm do gene *ADA2.1*, além de aumentar os níveis de ADP e reduzir a quantidade de AMP, ADO e INO no meio. O tebuconazol foi capaz de aumentar a distância ocular de larvas aos 5 dpf e reduzir a capacidade exploratória desses animais, e ainda diminuir a atividade locomotora de peixe-zebra adultos expostos por 96 horas. Além disso, este fungicida diminuiu a atividade da AChE tanto em larvas de 5 dpf, quanto em encéfalo de animais adultos. Além do mais, o tebuconazol aumentou a expressão relativa de mRNA da AChE em larvas, no entanto, não alterou em adultos. A exposição ao diclorvos, nas fases iniciais do desenvolvimento (1 hpf - 7 dpf), reduziu o tamanho corporal, a taxa de batimentos cardíacos e a superfície dos olhos de larvas de 7 dpf, bem como afetou a capacidade de escape de larvas aos 7 e 14 dpf. Além disso, reduziu a capacidade exploratória aos 7 e 14 dpf, padrão mantido

quando os animais tornaram-se adultos jovens aos 30 dpf, e adultos aos 70 dpf. No entanto, as análises realizadas aos 120 dpf mostraram recuperação da atividade comportamental similar ao grupo controle. A análise aos 120 dpf da exposição ao diclorvos nas fases iniciais do desenvolvimento sobre as enzimas do sistema purinérgico mostrou que este inseticida é capaz de elevar a atividade da ecto-5'-nucleotidase e reduzir a atividade da ecto-ADA. Os resultados mostram que os agentes neurotóxicos, tais como Mn, diclorvos e tebuconazol têm atuação significativa sobre o comportamento do peixe-zebra em estágio larval e adulto, além de afetar diferentes sistemas de neurotransmissão. Tais alterações comportamentais podem estar associadas aos déficits observados nos mecanismos neuroquímicos e moleculares investigados.

Palavras chaves: Agrotóxicos; Manganês; Neurotoxicidade; Ectonucleotidases; Adenosina Desaminase; Acetilcolinesterase; Dopamina; Peixe-zebra.

ABSTRACT

Neurotoxic agents, such as pesticides, organic solvents and metals, are capable to alter normal CNS activity. Manganese (Mn) is a metal found in the environment, which when in excess, accumulates in the CNS making it a potential hazard to health. In addition to Mn, other neurotoxic agents can cause changes, leading to deficits in neurotransmission systems. The growth of crop pests has exponentially increased the use of agrochemicals to maintain plantations. The fungicide tebuconazole is a triazole used in crops, such as barley, wheat, peanuts and orchard fruits and related to behavioral and oxidative changes. The insecticide dichlorvos, belongs to organophosphate family, acts through the acetylcholinesterase (AChE) inhibition, leading to hyperstimulation of cholinergic receptors. Cholinergic system is characterized by the action of acetylcholine (ACh) on muscarinic and nicotinic receptors. The level of this molecule is regulated by acetylcholinesterase (AChE), which catalyzes degradation of ACh into choline and acetate. Purinergic system is characterized by the action of ATP and adenosine on purinoreceptor P2 and P1, respectively. The levels of these molecules are regulated by ectonucleotidases, which constitute the extracellular cascade for ATP hydrolysis to adenosine. Adenosine can be subsequently deaminated to inosine by action of adenosine deaminase (ADA). Dopamine (DA), synthesized from L-DOPA, is the neurotransmitter of the dopaminergic system and it acts through its D₁-D₅ receptors, controlling the start and execution of movement. This study aims to evaluate the effects of exposure to manganese and pesticides, such as dichlorvos and tebuconazole, on behavioral parameters in larval and adult zebrafish, as well as its effects on purinergic, cholinergic and dopaminergic signaling. Exposure to MnCl₂ in the early stages of development (1 hpf - 5 dpf) was able to reduce the distance traveled, absolute turn angle and mobile time of the larvae at 5, 7 and 10 dpf. In addition, it caused an increase in TH levels at 5 and 7 dpf, followed by a reduction at 10 dpf. There was also an increase in markers of cell death. In adult animals, exposure during 96 hours caused a reduction in distance traveled, number of line crossings and absolute turn angle, and an inhibition on memory acquisition through the inhibitory avoidance task. In addition, adult animals exposed to MnCl₂ showed increased levels of markers of cell death, TH and DOPAC (3,4-dihydroxyphenylacetic acid) in the brain. The 96-hour exposure to this metal was also able to inhibit the NTPDases and ecto-ADA activities and to reduce *ADA2.1*-mRNA transcripts, besides for increasing ADP levels and reducing the amount of AMP, ADO and INO in the incubation medium. Tebuconazole was able to increase the ocular distance of larvae at 5 dpf and reduce the exploratory behavior of these animals, and still decrease the locomotor activity of 96 hours exposed adult zebrafish. Moreover, this fungicide decreased AChE activity in both 5 dpf larvae and brains of adult animals. Exposure to dichlorvos (1 hpf - 7 dpf) reduced body length, heartbeat rate and larval surface at 7 dpf as well as affected the escape capacity of larvae at 7 and 14 dpf. Further, it reduced exploratory behavior at 7 and 14 dpf, maintaining this pattern when animals became young adults at 30 dpf, and adults at 70 dpf. However, the analysis performed at 120 dpf showed a recovery of behavioral activity equal to the control. In addition, the analysis of exposure to dichlorvos in the early stages of development at 120 dpf on the enzymes of the purinergic system, showed that this insecticide is able to elevate the ecto-5'-nucleotidase activity and reduce the ecto-ADA activity. The results showed that neurotoxic agents, such as Mn, dichlorvos and tebuconazole, play a role in the larval and adult behavior of zebrafish, and affect different

neurotransmission systems. Such behavioral changes may be associated with the deficits observed in neurochemical and molecular mechanisms investigated.

Keywords: Pesticides; Manganese; Neurotoxicity; Ectonucleotidases; Adenosine Deaminase; Acetylcholinesterase; Dopamine; Zebrafish.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 TOXICIDADE POR METAIS E AGROTÓXICOS	10
1.1.1 Manganês	11
1.1.2 Agrotóxicos	15
1.2 SISTEMA COLINÉRGICO	20
1.2.1 Acetilcolinesterase	22
1.3 SISTEMA PURINÉRGICO	23
1.3.1 Ectonucleotidasas e Adenosina Desaminase	25
1.4 SISTEMA DOPAMINÉRGICO	28
1.5 PEIXE-ZEBRA	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
ANEXO: Carta de aceite CEUA	60

1. INTRODUÇÃO

1.1 TOXICIDADE POR METAIS E AGROTÓXICOS

O SNC dos vertebrados é composto pelo encéfalo e medula espinhal, possuindo funções complexas e sofisticadas como a capacidade de controlar o comportamento, aprendizagem, fala, memória, desempenho de habilidades de rotina e interação com ambiente social (Bjørling-Poulsen et al., 2008; Julvez e Grandjean, 2009). Durante a vida pré-natal, o SNC humano se desenvolve a partir das células de origem ectodérmica do embrião para um órgão complexo constituído por milhares de milhões de células especializadas e altamente interligadas. Para alcançar o melhor desenvolvimento cerebral, os neurônios devem se mover ao longo de caminhos precisos, a partir de seus pontos de origem até os locais designados, estabelecendo conexões com outras células e criando a comunicação entre as células (Bjørling-Poulsen et al., 2008; Rice e Barone, 2000; Rodier, 1995). Todos esses processos devem ocorrer dentro de um período de tempo rigidamente controlado e, cada estágio de desenvolvimento tem de ser alcançado na programação e na sequência corretas. Se um processo de desenvolvimento no SNC é interrompido ou inibido, existe um pequeno potencial para a reparação mais tarde, mas caso essa reparação não ocorra, consequências permanentes podem ser desenvolvidas (Bjørling-Poulsen et al., 2008; Rice e Barone, 2000).

Agentes neurotóxicos são capazes de alterar o desenvolvimento do SNC, especialmente se a exposição acontecer durante o início do período de desenvolvimento

(Grandjean e Landrigan, 2006). Entre os agentes documentados estão produtos químicos industriais, como pesticidas, solventes orgânicos ou metais, que são comumente encontrados no ar, alimentos, água ou solo. Além disso, fumo, álcool e algumas drogas também são considerados agentes neurotóxicos (Huizink e Mulder, 2006; Julvez et al., 2007). Se os processos de desenvolvimento do sistema nervoso imaturo são prejudicados, os efeitos podem ser duradouros e permanentes, levando a déficits na capacidade mental e desordens comportamentais (Andersen et al., 2000; Bellinger et al., 1987; Debes et al., 2006; Grandjean e Landrigan, 2006; Hu et al., 2006; Huizink e Mulder, 2006; Julvez et al., 2007). Com relação a aspectos sociais, as consequências da neurotoxicidade durante o desenvolvimento incluem aumento da probabilidade de insucesso escolar, produtividade econômica diminuída e aumento do risco de comportamento anti-social ou sociopatias (Grandjean e Landrigan, 2006). Além disso, já se sabe que alguns metais, tais como zinco e ferro, e agrotóxicos, como o paraquat e o carbaril, podem causar morte neuronal por apoptose em diversas áreas cerebrais (Bortolotto et al., 2014; Franco et al., 2010; Morris e Levenson, 2013; Schock et al., 2012).

1.1.1 Manganês

Comumente encontrado no meio ambiente, o manganês (Mn; Figura 1) é necessário para o crescimento normal, desenvolvimento e homeostase celular (Erikson et al., 2005a; Keen et al., 1981; 1986; 1999; Rehnberg et al., 1982). Especificamente, o Mn é importante na formação dos ossos, metabolismo de lipídeos e carboidratos, regulação da glicemia e absorção de cálcio. Embora rara, a deficiência de Mn pode contribuir para defeitos congênitos, diminuição da fertilidade, malformação óssea, fraqueza e maior susceptibilidade a convulsões (Aschner et al., 2002; Keen et al., 1999).

Em seres humanos e animais, o Mn funciona como um co-fator de várias enzimas necessárias para a função das células neuronais e gliais, bem como, das enzimas envolvidas na síntese de neurotransmissores e no metabolismo (Butterworth, 1986; Erikson e Aschner, 2003; Roth et al., 2013), tais como glutamina sintetase, arginase, piruvato descarboxilase e superóxido dismutase mitocondrial (Wedler e Denman, 1984). Além disso, dados *in vitro* têm demonstrado o papel do Mn no processo de formação de astrócitos (Liao e Chen, 2001).



Figura 1: Manganês. Disponível em: (<http://www.quimlab.com.br>).

O Mn existe sobre várias formas químicas, incluindo os estados de oxidação (Mn^{+2} , Mn^{+3} , Mn^{+4} , Mn^{+6} , Mn^{+7}), sais (sulfato e gluconato) e quelatos (aspartato, fumarato, succinato). Por ter propriedades químicas versáteis, o Mn é muito utilizado na indústria na fabricação de vidros e cerâmicas, em adesivos, solda, pintura e aditivos antidetonantes da gasolina (metilciclopentadienil tricarbonil manganês - MMT) (Harford et al., 2015; Najamuddin et al., 2016). As vias de exposição do Mn são principalmente através da ingestão, absorção dérmica e inalação (Harangi et al., 2016). Além disso, o Mn na dieta é encontrado especialmente em cereais integrais, nozes e sementes,

principalmente a partir de fórmulas a base de soja, chás, legumes, abacaxi e feijões (Aschner et al., 2007; Krachler e Rossipal, 2000).

Apesar de sua essencialidade, quando em excesso, o Mn pode acumular-se no SNC, tornando-se um perigo potencial para a saúde, sendo seus principais grupos de risco indivíduos que estão constantemente expostos a produtos com altas concentrações deste metal, tais como mineiros, soldadores, fabricantes de baterias e mecânicos (Cotzias e Greenough, 1958; Lander et al., 1999; Lucchini et al., 1997; Roth e Garrick, 2003; Wang et al., 2008). Além disso, a poluição com Mn tem sido um assunto de preocupação ambiental devido ao consumo de água contaminada, bem como, um risco com relação à nutrição a partir de fórmulas a base de soja (Krachler e Rossipal, 2000). Análises do GIAIA (Grupo Independente para Avaliação de Impacto Ambiental), realizadas após o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana-MG (Figura 2), demonstraram que o nível de Mn, encontrado na água superficial do ponto J2 (ponto após a barragem de rejeitos), logo após o desastre, era 53 vezes acima do limite permitido pelo CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) que é de 0,1 mg/L. Análises ao longo do caminho dos dejetos mostraram que, no ponto J17 localizado no Rio Doce em Regência-ES, os índices desse metal ainda apresentavam-se aumentados em cerca de 10 vezes, mesmo longe do acidente (CONAMA, 2005; GAIA, 2016).

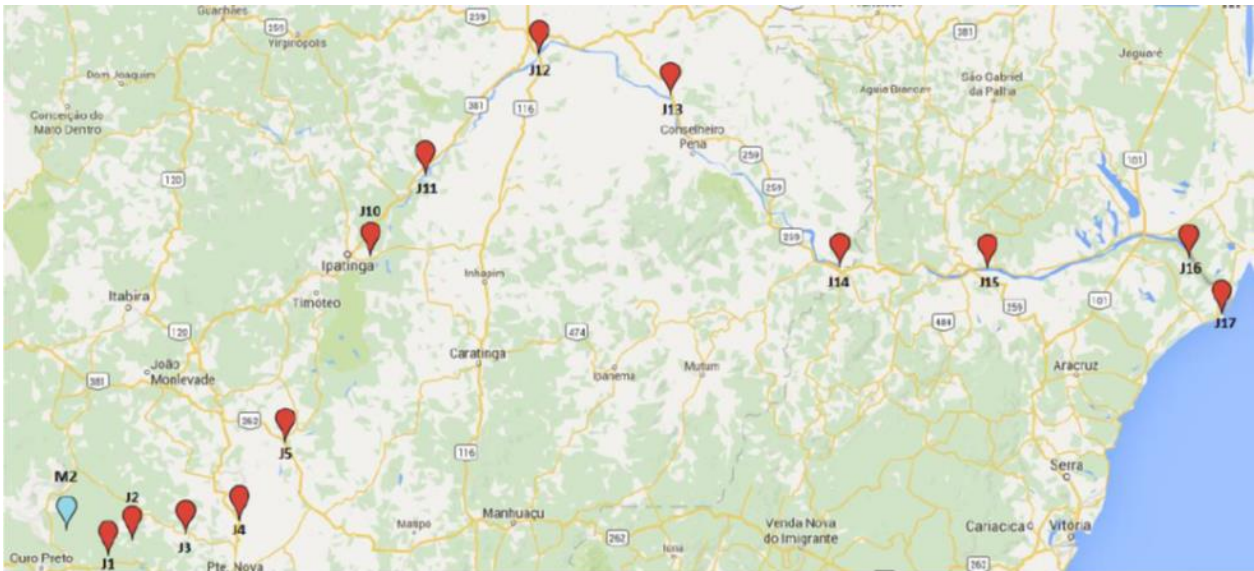


Figura 2: Mapa de pontos coletados na primeira expedição do relatório técnico do GIAIA.

Disponível em: (<http://giaia.eco.br>).

Esse aumento dos níveis de Mn, elevando o contato com este metal pode acarretar na sua deposição no SNC, que leva a uma doença neurotoxicológica grave denominada manganismo (Bowler et al., 2011; Erikson et al., 2005b; Lucchini et al., 2009). Essa desordem é caracterizada por um conjunto de sintomas extrapiramidais que se assemelham a Doença de Parkinson (DP), incluindo instabilidade postural, distonia, fraqueza, tremores, salivação excessiva, distúrbio da fala, anorexia, apatia e dores musculares e articulares (Bowler et al., 2011; Guilarte, 2010; Kim et al., 2011; Mergler e Baldwin, 1997; McMillan, 1999; Olanow et al., 1996; Olanow, 2004; Pal et al., 1999; Roth, 2009). Pouco depois do aparecimento desses sintomas, os pacientes também apresentam perda de memória, comportamento compulsivo, ilusões, delírios, e desorientação, que é conhecido como loucura mangânica, que se assemelha muito com a esquizofrenia (Finkelstein et al., 2007; Shukla e Singhal, 1984; Tomás-Camardiel et al., 2002; Zhang et al., 2011).

Os mecanismos de neurotoxicidade do Mn, que levam a alterações neuroquímicas, tais como comprometimento na homeostase do ferro, excitotoxicidade, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, indução da agregação de proteínas e alteração nas condições homeostáticas de outros metais bivalentes que compartilham sistemas de transportadores (Aschner et al., 2002; Erikson et al., 2005a; Normandin et al., 2004; Seth e Chandra, 1984) têm sido associados com danos nos neurônios dopaminérgicos no globo pálido, estriado e substância nigra (Aschner et al., 2005; Liccione e Maines, 1989; Morello et al., 2008). Em geral, o Manganismo é inicialmente ligado a alteração da neurotransmissão no globo pálido, ao passo que a DP está preferencialmente associada à perda de neurônios dopaminérgicos na *substantia nigra* (Lucchini et al., 2009). Apesar desta diferença, os sintomas do Manganismo são muitas vezes confundidos com parkinsonismo pelos médicos e, apesar das áreas cerebrais atingidas pelos dois transtornos serem distintas nas fases iniciais, há evidências crescentes de que a exposição crônica a níveis elevados de Mn pode estar correlacionada com o aumento da suscetibilidade para desenvolver o parkinsonismo, mostrando a existência de sistemas neuroquímicos comuns sendo alterados (Gorell et al., 1999; Hudnell, 1999; Kim et al., 2002).

1.1.2 Agrotóxicos

A agricultura é praticada pela humanidade há mais de dez mil anos; no entanto, o uso intensivo de agrotóxicos para o controle de pragas e doenças das lavouras existe há pouco mais de meio século (Londres, 2011). Na última década, o uso de agrotóxicos no Brasil assumiu proporções assustadoras. Em 2011, as vendas de defensivos movimentaram quase US\$ 8,5 bilhões, o dobro do apurado em 2005. Entre os anos de

2006 e 2011, houve um aumento significativo nas vendas das principais classes de defensivos agrícolas (SINDAG, 2012). Desde 2008, o Brasil passou a ocupar o primeiro lugar no ranking mundial de consumo de agrotóxicos, substituindo os Estados Unidos nesta posição. Enquanto nos últimos dez anos o mercado mundial desse setor cresceu 93%, no Brasil, esse crescimento foi de 190%, de acordo com dados divulgados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão de controle do Ministério da Saúde (ANVISA, 2009). O uso de fungicidas, produto destinado a combater doenças como a ferrugem da soja mais que triplicou, de 56 mil para 174 mil toneladas. As vendas de inseticidas avançaram quase 84%, de 93,1 mil para 170,9 mil toneladas. Já os herbicidas, agentes químicos usados no combate a ervas daninhas, alcançaram 403,6 mil toneladas em 2011 - um aumento de 44% em relação as 279,2 mil toneladas em 2006 (SINDAG, 2012).

Os agrotóxicos representam grande perigo à saúde humana, principalmente aos indivíduos que estão em contato direto e permanente com estes compostos. Dentre os danos provenientes da exposição crônica que esses defensivos podem causar, estão o aborto ou nascimento de bebês com defeitos congênitos, doenças neurológicas, hepáticas, respiratórias, renais e ainda câncer (Londres, 2011). Já a intoxicação aguda pode ocorrer de forma leve, moderada ou grave e seus efeitos incluem dores de cabeça, náuseas, vômitos, dificuldades respiratórias, fraqueza, salivação, cólicas abdominais, tremores, confusão mental, convulsões, podendo levar ao coma (Londres, 2011). Uma vez que os danos provocados pelos defensivos agrícolas são diversos, e cada um apresenta composições que os tornam mais nocivos ou não em relação a outros de mesma indicação, a ANVISA classificou os agrotóxicos licenciados no Brasil em quatro

classes de acordo com o perigo para a saúde do ponto de vista dos efeitos agudos (ANVISA, 2012) (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação toxicológica dos agrotóxicos *

Classes	Toxicidade	Cor na embalagem
Classe I	Extremamente tóxico	Faixa vermelha
Classe II	Altamente tóxico	Faixa amarela
Classe III	Moderadamente tóxico	Faixa azul
Classe IV	Pouco tóxico	Faixa verde

* A classificação toxicológica dos agrotóxicos é feita em função de estudos laboratoriais com exposição oral, dérmica e inalatória para determinar a CL50 e DL50 (Concentração Letal e Dose Letal), dadas em miligramas do produto tóxico por quilo de peso corporal necessário para matar 50% dos ratos ou outros animais expostos ao produto (ANVISA, 2012).

Atualmente existe uma grande preocupação com relação a contaminação ambiental por agrotóxicos. Estudos demonstraram que o nível de alguns agentes agrícolas utilizados no país está ultrapassando os valores aceitáveis pelo CONAMA (Caldas et al., 2013; Fismes et al., 2002; Montagner et al., 2014; Pinheiro et al., 2011). Um estudo realizado no Rio São Francisco (Minas Gerais) quantificou diferentes agrotóxicos em músculos e vísceras do peixe *Prochilodus costatus*. Foi detectada a presença de pelo menos nove diferentes agentes agrícolas nesses animais, pertencentes às famílias dos organofosforados e carbamatos. Também foi constatada a presença de diferentes fungicidas evidenciando o acúmulo de diferentes classes de agrotóxicos nas águas do Rio São Francisco (Oliveira et al., 2015). Além disso, foi verificada a presença de agrotóxicos nas águas do Rio dos Sinos (Rio Grande do Sul) onde os resultados demonstraram que as concentrações dos agentes tóxicos analisados eram inferiores às

recomendadas pelo CONAMA. No entanto, após monitoramento do potencial de citotoxicidade e genotoxicidade em células expostas à água do Rio dos Sinos, foi constatado efeito em ambas análises toxicológicas, mostrando que apesar de baixos os níveis de agentes agrícolas, ainda assim eram capazes de causar alterações (Bianchi et al., 2017).

Os organofosforados estão entre os compostos mais conhecidos e utilizados como defensivos agrícolas (Coggon, 2002; Kachaiyaphum et al., 2010). No entanto, eles exercem uma variedade de efeitos adversos à saúde e ao meio ambiente (Peter et al., 2010), atuando através da inibição da acetilcolinesterase (AChE), o que provoca acúmulo de acetilcolina (ACh) na fenda sináptica, levando à hiperestimulação dos receptores colinérgicos, causando uma crise colinérgica aguda, caracterizada por convulsões, alteração na ventilação e desequilíbrio metabólico (Bajgar, 2004; Barthold e Schier 2005; Jokanovic, 2009). O diclorvos (Figura 3a) é um inseticida altamente tóxico (classe II) pertencente à família dos organofosforados. Ele é utilizado no controle de insetos que vivem no arroz, cereais, frutas, legumes, soja e algodão, sendo eficaz contra pulgões, ácaros, lagartas, tripés, mosca branca, entre outros (Binukumar et al., 2012). Este organofosforado pode causar intoxicação através da inalação, absorção cutânea ou ingestão, podendo ficar depositado no fruto ou água (Ning et al., 2012). A exposição crônica ao diclorvos causa disfunções hepáticas (Binukumar et al., 2010), e já foram relatadas mutações somáticas em ratos tratados por via oral e intraperitoneal com uma dose elevada deste composto (Pletsa et al., 1999).

Devido à periculosidade de intoxicação apresentada pelos agrotóxicos de classe II, compostos que apresentam taxa de toxicidade moderada (classe III) estão ganhando espaço no mercado. E ainda estão disponíveis compostos de classe IV, considerados

pouco tóxicos, sendo estes já amplamente utilizados contra pragas de lavoura. O tebuconazol (Figura 3b) é um fungicida da classe triazol utilizado em culturas como a cevada, trigo, amendoim e frutas do pomar (Battaglin et al., 2011), além de possuir propriedades de recuperação em cultivos de couve de bruxelas, repolho, brócolis, couve-flor, cenoura e alho-poró (Sahoo et al., 2012), e também é usado na preservação da madeira (Łebkowska et al., 2003). O tebuconazol exibe sua atividade antifúngica inibindo a enzima lanosterol 14 α -desmetilase e com isso diminuindo a biossíntese de ergosterol, o principal esteróide da membrana plasmática da maioria dos fungos, necessário para manter a fluidez e a permeabilidade da membrana celular de fungos (Filipov e Lawrence, 2001; Kwok e Loeffler, 1993; Lamb et al., 1998; Moser et al, 2001). No entanto, estudos demonstraram que este fungicida é capaz de alterar os níveis de espécies reativas ao Ácido Tiobarbitúrico e a atividade da glutationa-S-transferase e catalase, causando estresse oxidativo em carpas (Toni et al., 2011). Além disso, o tebuconazol mostrou ser capaz de alterar o aprendizado de ratos, avaliados através do labirinto aquático de Morris (Moser et al., 2001).

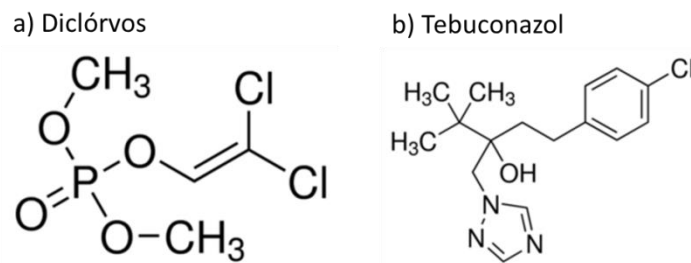


Figura 3: Estrutura química dos agrotóxicos diclórvos (a) e tebuconazol (b).

1.2 SISTEMA COLINÉRGICO

O sistema colinérgico tem um papel fundamental em várias funções vitais (Mesulam et al., 2002), sendo a acetilcolina (ACh) o neurotransmissor mais importante desse sistema (Descarries et al., 1997; Geffard et al., 1985). A ACh desempenha um papel fundamental no SNC e está relacionada à modulação da resposta neuronal por estímulos sensoriais (Murphy e Sillito, 1991), ao comportamento, à participação em circuitos neurais do controle do sono, ao aprendizado e memória (Shaked et al., 2008).

A acetilcolina (ACh) foi descoberta em meados de 1920 e representa o primeiro neurotransmissor da história da neurociência (Brown, 2006). Considerada um neurotransmissor clássico, a síntese de ACh é realizada pela enzima colina acetiltransferase e depende da disponibilidade de acetil-CoA e colina, um importante produto do metabolismo de lipídeos no meio intracelular. A colina usada na síntese de ACh pode vir diretamente da reciclagem da ACh, que é hidrolisada na fenda sináptica, ou a partir da fosfatidilcolina. Transportadores de colina dependentes de sódio são responsáveis por transportar a colina para os terminais colinérgicos e são o passo limitante para a síntese de ACh (Oda, 1999; Okuda et al., 2000). Após a síntese, a ACh é transportada dentro de vesículas para os terminais dos axônios colinérgicos, onde é armazenada. Sua liberação depende das variações no potencial elétrico das membranas dos terminais nervosos e este processo está relacionado com a concentração de cálcio intracelular. Ao ser liberada, a ACh interage com receptores específicos, nicotínicos e muscarínicos, causando despolarização e propagação do potencial de ação na célula pós-sináptica (Edwards et al., 2007; Oda, 1999; Park et al., 2008; Schröder et al., 1989; van der Zee et al., 1989).

Os receptores nicotínicos (nAChRs) consistem de cinco subunidades designadas α , β , γ e δ , sendo que a subunidade α é expressa em duas formas. Uma variedade de estudos mostra a expressão deste receptor em vertebrados e citam ainda mudanças na estrutura das subunidades, gerando um total de 17 subunidades ($\alpha 1$ - $\alpha 10$, $\beta 1$ - $\beta 4$, γ , δ e ϵ) (Green e Millar, 1995; Millar e Harkness, 2008; Millar e Gotti, 2009). A ACh se liga normalmente a subunidade α , produzindo mudanças conformacionais que permitem a passagem principalmente de cátions, sendo responsáveis pelo aumento do influxo de íons como Na^+ , K^+ e Ca^{+2} . Os nAChRs estão envolvidos em mecanismos de recompensa no SNC, o que explica em grande parte o mecanismo do uso de tabaco e nicotina (Picciotto et al., 1998). Já os receptores muscarínicos (mAChRs) estão envolvidos na neurotransmissão e neuromodulação (Castillo et al., 1999; Ghatpande et al., 2006), memória olfatória (Linster et al., 2001; Prediger et al., 2006; Ravel et al., 1994), aquisição de tarefas (De Rosa e Hasselmo, 2000), além de aprendizado e memória (Anagnostaras et al., 2003). Os mAChRs se associam às proteínas G e consistem em cinco tipos diferentes de receptores (M1-M5) com distintas propriedades moleculares e funcionais. Os receptores M1, M3 e M5 são acoplados a proteína Gq e sua estimulação promove a neurotransmissão por hidrólise do fosfoinosítideo e ativação da fosfolipase C. Já os receptores M2 e M4 inibem a atividade da adenilato ciclase via proteína Gi (Bymaster et al., 2003; Wess, 2004).

A ACh que permanece na fenda sináptica é degradada pelas colinesterases que a clivam em colina e acetato, eliminando os efeitos desencadeados por esta molécula. Existem dois diferentes tipos de colinesterases, que são classificadas de acordo com suas propriedades catalíticas, especificidade de inibidores e distribuição nos tecidos: a acetilcolinesterase (AChE) (E.C.3.1.1.7) e a butirilcolinesterase (BuChE) (E.C.3.1.1.8). A

AChE hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil, presente principalmente nas sinapses dos sistemas nervoso central e periférico parassimpático e ainda junção neuromuscular; e a BuChE hidrolisa outros tipos de ésteres como a butirilcolina (Alles e Hawes, 1940; Augustinsson e Nachmansohn, 1949; Massoulié et al., 2008; Mendel et al., 1943; Soreq e Seidman, 2001). Ambas as colinesterases são amplamente distribuídas no organismo.

1.2.1 Acetilcolinesterase

A AChE é uma serina hidrolase sintetizada no retículo endoplasmático, processada e transportada para o meio extracelular pela presença de um peptídeo sinal na região N-terminal. Ela desempenha um papel essencial no mecanismo colinérgico, catalisando a hidrólise natural do substrato acetilcolina em acetato e colina (Massoulié et al., 2008). Esta enzima possui uma tríade catalítica, composta por um ácido glutâmico, uma histidina e um resíduo de serina. O grupo carboxílico do ácido glutâmico ativa o grupamento hidroxila da serina que então hidrolisa as funções éster da ACh por ataque nucleofílico (Shafferman et al, 1992). Duas formas moleculares desta enzima são descritas: uma com forma assimétrica e outra com forma globular. A forma globular é encontrada preferencialmente em encéfalos de mamíferos com múltiplas subunidades, ficando algumas livres no citosol e outras ligadas à membrana (Heller e Hanahan, 1972; Taylor e Radic, 1994).

A AChE pode ser usada como um marcador da função colinérgica, uma vez que seus níveis parecem ser controlados pela interação da ACh com seus receptores, sendo que quando a interação é acentuada, aumentam os níveis de AChE, e mudanças na atividade da enzima podem indicar alterações na disponibilidade de ACh e do nível de

expressão de seus receptores (Colović et al., 2013; Fernandez e Hodges-Savola, 1992). Além disso, a AChE também pode modular funções não colinérgicas, tais como glutamatérgicas e dopaminérgicas (Shaked et al., 2008; Soreq e Seidman, 2001; Zimmermann e Soreq, 2006).

1.3 SISTEMA PURINÉRGICO

O sistema purinérgico tem como molécula sinalizadora o ATP, um nucleotídeo trifosfatado existente em todas as células. Esta sinalização é uma rota comum de comunicação célula-célula envolvida em muitos mecanismos neuronais e não neuronais e em eventos de curta e longa duração, além da regulação de vários processos fisiopatológicos no meio extracelular (Agteresch et al., 1999; Burnstock e Knight, 2004; Hoebertz et al., 2003).

O ATP é armazenado em vesículas nas terminações sinápticas e, após despolarização neuronal, é liberado pela ação de mecanismos fisiológicos ou em resposta a danos celulares como hipóxia, atuando, tanto como transmissor quanto como co-transmissor, em receptores específicos, denominados purinoreceptores (Burnstock, 1972; 1976; 2008; Ralevic e Burnstock, 1998). Os purinoreceptores nos quais o ATP age são do tipo P2, divididos em duas famílias distintas de acordo com a base do mecanismo de ação, farmacologia e estrutura molecular, sendo eles P2X e P2Y (Burnstock e Kennedy, 1985; Burnstock, 2012).

Os receptores da família P2X estão distribuídos em neurônios, células gliais e no músculo liso e divididos em sete membros (P2X1-7). São receptores ionotrópicos, que quando ativados, levam à abertura de um poro na membrana celular que permite a

passagem de cátions Na^+ , K^+ e Ca^{2+} (Fields e Burnstock, 2006; Kirischuk et al., 1995a,b; Moller et al., 2000; North, 2002; North e Verkhratsky, 2006). Já os receptores da família P2Y, são metabotrópicos, acoplados à proteína G e apresentam uma ampla distribuição nos tecidos e sistemas, tais como vascular, nervoso e cardíaco. Nesta classe, foram funcionalmente descritos oito membros (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14) (Burnstock, 2007; Díaz-Hernandez et al., 2002; Erb et al., 2006; Zimmermann, 2011).

Uma vez que o ATP não é capaz de atravessar as membranas biológicas por difusão ou transporte ativo, o controle de sua concentração extracelular é realizado pela ação das ectonucleotidases que catalisam sua conversão até adenosina (ADO) (Bonan, 2012; Robson et al., 2006; Zimmermann et al., 2016). Além da sua disponibilidade na fenda sináptica através da hidrólise do ATP, o transporte de adenosina através da membrana é regulado por transportadores equilibrativos de nucleosídeos, que seguem o gradiente de concentração; e transportadores concentrativos de nucleosídeos, que medeiam o influxo contra o gradiente (King et al., 2006). Estudos recentes demonstraram que a ADO está presente dentro de vesículas no terminal pré-sináptico. Sua formação ocorre intraneuronalmente a partir do AMP, sendo então internalizada nas vesículas pelos transportadores concentrativos de nucleosídeos e assim liberada na fenda sináptica por mecanismo de excitação, dependente de Ca^{2+} (Corti et al., 2012; Melani et al., 2012). A ADO exerce papel de neuromodulação através da regulação de importantes mecanismos no SNC, como estados de ansiedade (López-Cruz et al., 2016; Maximino et al., 2011; Nazario et al., 2015), sono (Carús-Cadavieco e de Andrés, 2012; Porkka-Heiskanen, 1999), cognição e memória (Ribeiro et al., 2003; Shen et al., 2012; Wei et al., 2011), dentre outros.

A ADO exerce seus efeitos através da ativação de receptores purinérgicos de membrana específicos do tipo P1, divididos em quatro subtipos de acordo com suas características, como estrutura molecular, distribuição tecidual e afinidade pelo seu ligante. São eles: os receptores A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, sendo todos acoplados à proteína G e exibindo sete domínios transmembrana formados por aminoácidos hidrofóbicos (Fredholm et al., 2000; Libert et al., 1989; Maenhaut et al. 1990; Stehle et al. 1992). Os receptores A₁ e A₃ se ligam à família das proteínas Gi/o, responsáveis pela inibição da produção do segundo mensageiro AMPc. Os receptores A_{2A} e A_{2B} estimulam a produção de AMPc via ativação de proteínas Gs (Daly, 1985; Fredholm et al., 2001, 2011; Ralevic e Burnstock, 1998). Além disso, os receptores A₁, através de Gi_{1/2/3} e A_{2B} e A₃ através de Gq, ativam a liberação de inositoltrisfosfato (IP₃) and diacilglicerol (DAG) através da das enzimas fosfolipases C (PLC) (Rebecchi e Pentylala, 2000; Schulte e Fredholm, 2003; Sternweis e Smrcka, 1993).

1.3.1 Ectonucleotidases e Adenosina Desaminase

Os nucleotídeos extracelulares, após atuarem como moléculas sinalizadoras, são inativados por uma cascata de hidrólise constituída por uma variedade de enzimas, dentre elas as ectonucleotidases (Figura 4). 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. São elas: a família das E-NPPs (ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase), a família das E-NTPDases (ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases), fosfatases alcalinas a ecto-5'-nucleotidase (Zimmermann, 1992; 1996a; 1996b; 2011). Neste estudo, abordaremos as NTPDases e a ecto-5'-nucleotidase.

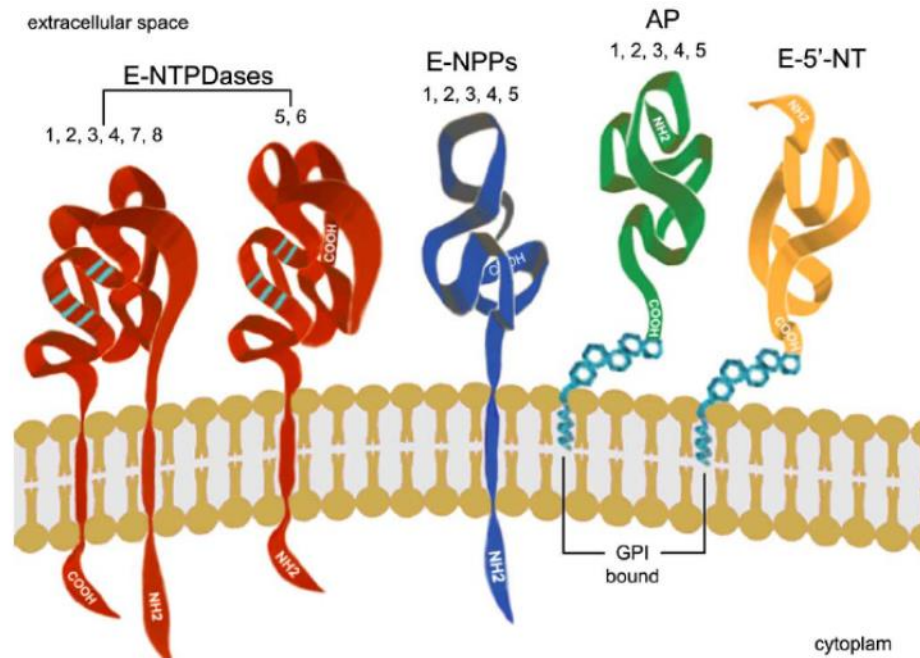


Figura 4: Enzimas extracelulares responsáveis pela degradação de nucleotídeos. As ectonucleotidases apresentam o sítio catalítico voltado para o espaço extracelular. NTPDases e a ecto-5'-nucleotidase atuam na conversão de ATP a adenosina. Fosfatases alcalinas hidrolisam nucleotídeos monofosfatados e as NPPs atuam no catabolismo extracelular dos dinucleotídeos. (Cognato e Bonan, 2010)

As ectonucleotidases controlam a disponibilidade de ligantes (ATP, ADP, AMP e ADO) para ambos os receptores de nucleotídeos e nucleosídeos e, conseqüentemente, a extensão e a duração da ativação do receptor (Chen e Guidotti, 2001). Portanto, essa é uma via enzimática com função dupla de remoção de uma molécula sinalizadora, ATP, e geração de uma segunda molécula, a ADO (Abbracchio et al., 2009; Burnstock e Verkhratsky, 2009; Zimmermann, 1996a; 1996b). As NTPDases são responsáveis pela hidrólise de ATP em ADP e AMP. A desfosforilação do nucleotídeo monofosfatado AMP, é realizada pela enzima ecto-5'-nucleotidase, gerando fosfato livre e ADO. Esta última é

desaminada pela enzima adenosina desaminase (ADA) (EC 3.5.4.4) (Robson et al., 2006; Bonan, 2012).

As NTPDases são codificadas por oito genes diferentes chamados *entpd*. Quatro destas enzimas (NTPDases 1, 2, 3 e 8) estão localizadas na membrana celular com o sítio ativo voltado para o meio extracelular; duas estão localizadas intracelularmente (NTPDases 4 e 7) e duas (NTPDases 5 e 6) são excretadas de forma heteróloga após expressão intracelular (Robson et al., 2006). Estas enzimas hidrolisam tanto ATP como ADP, formando AMP na presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} (Bigonnesse et al. 2004; Robson et al., 2006; Rosemberg et al., 2010).

A ecto-5'-nucleotidase desfosforila o AMP até ADO, através da hidrólise da ligação fosfodiéster de 5'-ribonucleotídeos, levando à formação do correspondente ribonucleosídeo e fosfato. As ecto-5'-nucleotidases apresentam uma ampla distribuição tecidual e fazem parte da cascata enzimática para finalizar a ação de nucleotídeos que agem em receptores P2X e P2Y, sendo a principal enzima responsável pela produção de ADO extracelular (Cunha, 2001; Kluge et al., 1972; Robson et al., 2006; Zimmermann, 1992; 1996a; 2011).

A ADA é uma enzima que promove a desaminação hidrolítica da ADO e da deoxiadenosina até inosina (INO) e deoxiinosina, respectivamente. Ela é encontrada como uma enzima citosólica e pode ser expressa na superfície celular como uma ectoenzima, possuindo função importante no sistema imune, controlando os níveis de ADO (Franco et al., 1997; Haskó et al., 2000; Hirschhorn e Ratech, 1980; Zavialov e Engström, 2005). Diferentes membros da ADA, apresentando características cinéticas distintas, já foram descritos, sendo eles ADA1 e ADA2 além de um grupo similar desta família de proteínas denominado ADAL (*adenosine deaminase-like*) (Hirschhorn e

Ratech, 1980; Maier et al., 2005; Zavialov e Engström, 2005). Todos estes membros foram classificados como subfamílias pertencentes ao grupo das adenil-desaminases. Por apresentar sítios de aminoácidos importantes relacionados à desaminação de adenosina e motivos conservados entre as subfamílias da ADA, é possível que a ADAL também realize a desaminação hidrolítica de ADO a INO (Maier et al., 2005).

1.4 SISTEMA DOPAMINÉRGICO

A sinalização dopaminérgica é conhecida por regular uma grande variedade de processos fisiológicos e comportamentais, como por exemplo, a atividade motora, a cognição e a memória, o humor, a aprendizagem e o sistema de recompensa (Bjorklund e Dunnett, 2007; Goldman-Rakic 1998; Jones e Miller, 2008; Oberlander et al., 1979; Ungerstedt, 1976). O seu neurotransmissor é a dopamina (DA), um tipo de catecolamina essencial no controle de várias funções a nível cerebral (Iversen e Iversen, 2007). Cerca de 80% do total da DA no SNC encontra-se no estriado, enquanto que o restante está distribuído difusamente pelo córtex e outras regiões cerebrais (Missale et al., 1998). Além do seu papel como neurotransmissor, a DA também serve como precursor de noradrenalina. Os neurónios noradrenérgicos contêm uma enzima chamada DA beta-hidroxilase que converte DA em noradrenalina (Kaufman e Friedman, 1965; Levin et al., 1960). A disfunção na sinalização dopaminérgica está associada a uma série de patologias comportamentais como a DP, esquizofrenia, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, bem como, abuso de drogas e álcool (Bowton et al., 2010; Cortese et al., 2005; Florán et al., 2002; Gurevich e Joyce, 1999; Hirsch, 1992; Missale et al, 1998; Zeiss, 2005).

A neurotransmissão dopaminérgica ocorre por meio de vários processos relacionados, incluindo a síntese, liberação, captação, armazenamento, catabolismo, e ativação do receptor de DA (Jones e Miller, 2008). A síntese de DA é modulada pela atividade da tirosina hidroxilase (TH). A enzima TH quando ativada converte o aminoácido L-tirosina em L-DOPA, que é descarboxilado para formar a DA (Missale et al., 1998; Yamamoto et al., 2010). Uma vez sintetizada, a DA é armazenada em vesículas pré-sinápticas, que são transportadas para o terminal sináptico pelo transportador de monoamina vesicular (VMAT). A ação da DA ocorre a partir da sua liberação na fenda sináptica (Lapish et al., 2007; Sesack et al., 2003). Dois modos distintos de liberação de DA são promovidos pelos neurônios dopaminérgicos: um com atividade fásica, representado pelo padrão explosivo de disparos que ocorrem em reposta a estímulos comportamentais, e; o outro, com atividade tônica que ocorre através de disparos espontâneos destes neurônios. A liberação fásica de DA ativa os receptores pós-sinápticos, que é rapidamente removida da fenda por mecanismos de recaptção, enquanto a liberação tônica determina os níveis extracelulares deste neurotransmissor em estruturas sub-corticais (Missale et al, 1998).

A DA age através da sua difusão no fluido extracelular a partir do qual é eliminada lentamente como resultado da recaptção, metabolismo e ativação dos seus receptores (Ciliax et al., 1995, 1999; Venton et al., 2003). Existem cinco receptores de DA D₁, D₂, D₃, D₄ e D₅, através dos quais ela pode controlar o início e execução de movimento (Han et al., 2007). Os receptores de DA podem ser divididos em receptores D_{1-like} (D₁, D₅) e D_{2-like} (D₂, D₃, D₄), agrupados por suas propriedades farmacológicas e similaridade de sequência. Estes receptores são metabotrópicos e acoplados à proteína G. A ativação dos receptores de DA D_{1-like} estimulam a proteína G α_s , que por sua vez ativa a adenilato

ciclase, aumentando AMPc, enquanto os receptores *D2-like* acoplados a proteína $G\alpha_{i/o}$, exercem influência negativa sobre a atividade da adenilato ciclase, diminuindo o AMPc (Hurley e Jenner, 2006; Missale et al, 1998; Sibley e Monsma, 1992; Sokoloff e Schwartz, 1995; Vallone et al., 2000; Verheij e Cools, 2008).

Os receptores de DA são bem distribuídos a nível cerebral, porém cada subtipo possui distribuição única (Arias-Carrión e Poppel, 2007; Saji et al., 2003). Os receptores D_1 possuem alta densidade no núcleo caudado, putâmen e núcleo accumbens (Gerfen et al., 1995; Aubert et al., 2000), sendo também encontrados em terminais pré-sinápticos com projeções glutamatérgicas para córtex e tálamo (Hurley et al., 2003). Os receptores D_5 possuem distribuição restrita e foram localizados no estriado ventral, glóbulo pálido e hipocampo (Khan et al., 2000). O receptor D_2 é o mais abundante da família *D2-like*, sendo encontrado em alta densidade no núcleo caudado, putâmen e núcleo accumbens, e ainda nos dendritos estriatopálidais gabaérgicos. Níveis moderados deste receptor foram detectados no tubérculo olfatório e insulas de Calleja e baixos níveis estão presentes na substância nigra (Beaulieu e Gainetdinov, 2011; Gurevich e Joyce, 1999). Os receptores D_3 possuem distribuição mais restrita que o D_2 , sendo que altos níveis deste receptor foram encontrados nas insulas de Calleja e em níveis menores em cerebelo, tálamo e hipotálamo (Hurley et al., 1996; Gurevich e Joyce, 1999). Por fim, os receptores D_4 são encontrados no córtex e regiões não estriadas, com baixos níveis de expressão em regiões estriadas (Primus et al., 1997).

1.5 PEIXE-ZEBRA

O peixe-zebra (Figura 5), *Danio rerio*, é um pequeno teleósteo (3-4 cm) de água doce utilizado como uma importante ferramenta para a realização de estudos nas áreas bioquímica (Baggio et al., 2017; Canzian et al., 2017; Siebel et al., 2015; Zimmermann et al., 2016), comportamental (Abreu et al., 2016; Rambo et al., 2016) e toxicológica (Haverroth et al., 2015; Oliveira et al., 2014), já que possui um rápido metabolismo e grande sensibilidade a fármacos (Altenhofen et al., 2015; Marcon et al., 2016; Singer et al., 2016), sendo considerado importante animal modelo para triagem de fármacos (Martinelli et al., 2017; Pissinate et al., 2016). O genoma do peixe-zebra foi completamente sequenciado e comparado ao de humanos, revelando que aproximadamente 82% dos genes relacionados com doenças humanas tem ao menos um ortólogo em peixe-zebra (Howe et al., 2013). Estes achados têm contribuído para o desenvolvimento de novas tecnologias e estratégias metodológicas sofisticadas como a geração de mutantes, morfolidos e tecnologia de microarranjos (Radev et al., 2015; Xia et al., 2012).

Essa espécie também tem sido bastante usada para estudos de biologia do desenvolvimento, uma vez que apresenta fecundação e reprodução externas, possuindo um ciclo biológico de desenvolvimento rápido e ao longo de todo o ano. Seus ovos são relativamente grandes e transparentes, podendo observar-se em tempo real a divisão celular e a formação de um novo organismo (Bai e Burton, 2011; Langheinrich, 2003; Shin e Fishman, 2002; Nery et al., 2014). A identificação e caracterização de sistemas de neurotransmissão, tais como sistema purinérgico, colinérgico e dopaminérgico, já foram realizadas em peixe-zebra (Rico et al., 2011).



Figura 5: Peixe-zebra. Disponível em: (www.zfin.org).

Com relação ao sistema purinérgico, a presença de uma NTPDase e uma ecto-5'-nucleotidase em membranas cerebrais já foi demonstrada em peixe-zebra, sendo estas caracterizadas como cátion-dependentes (Rico et al., 2003; Rosemberg et al., 2010; Senger et al., 2004). Estudos caracterizaram o padrão de expressão de dez ortólogos de NTPDases em peixe-zebra, sendo elas: NTPDase1 (Rosemberg et al., 2010), três isoformas da NTPDase2, nomeadas como NTPDase2_mv, NTPDase2_mq e NTPDase2_mg (Rico et al., 2006; Rosemberg et al., 2010), NTPDase 3 (Appelbaum et al., 2007; Rosemberg et al., 2010), NTPDase4, duas isoformas da NTPDase5, sendo NTPDase5_ms e NTPDase5_me, NTPDase6 e NTPDase8 nesta espécie (Rosemberg et al., 2010). Além disso, a clonagem e caracterização molecular dos receptores P2X já foram realizadas (Díaz-Hernandez et al., 2002; Norton et al., 2000). A subunidade P2X possui nove membros, sendo destes seis ortólogos aos genes dos receptores P2X de mamíferos (zfP2X1, zfP2X2, zfP2X3, zfP2X4, zfP2X5 e zfP2X7), dois parálogos (P2X3.2 e P2X4.2) e um gene (P2X6) ainda precisa ser devidamente classificado (Kucenas et al., 2003). Até o momento, foram identificados apenas receptores P2Y1 em trombócitos de peixe-zebra (Gregory e Jagadeeswaran, 2002). Estudos também identificaram os

receptores de ADO do tipo A₁, A_{2A}, e A_{2B} neste teleósteo (Boehmler et al., 2009; Capiotti et al., 2011).

A existência de diferentes genes relacionados à ADA, com um padrão de expressão ubíquo em peixe-zebra já foi caracterizada, mostrando a presença dos genes ADA1, ADAL e dois ortólogos de ADA2 (uma forma truncada ADA2-1 e ADA2-2) (Rosemberg et al. 2007). Além disso, a cinética enzimática e propriedades de desaminação da ADO a partir do cérebro de peixe-zebra também já foram descritas (Rosemberg et al., 2008). A desaminação da ADO no SNC de peixe-zebra promovida por diferentes membros da família da ADA pode ser um elemento-chave para o controle da ADO/INO no meio intracelular e extracelular (Rosemberg et al., 2008).

Com relação ao sistema colinérgico, sabe-se que o gene da ACh foi clonado e sequenciado e sua atividade enzimática já foi detectada no cérebro deste teleósteo (Bertrand et al., 2001; Rico et al., 2007). O peixe-zebra apresenta a AChE codificada por um único gene, porém várias formas moleculares são observadas (monômeros, dímeros, trímeros e tetrâmeros) como resultado da ocorrência de *splicing* alternativo nos éxons da região C-terminal (Massoulié et al., 2008). Além disso, subunidades de nAChRs e mAChR também são expressos nesta espécie (Zirger et al., 2003).

Os neurônios dopaminérgicos em embriões em desenvolvimento (Holzschuh et al., 2001) e também no peixe-zebra adulto já foram identificados (Rink e Wullimann, 2001). Os neurônios dopaminérgicos foram primeiro detectados entre 18 e 19 horas pós-fertilização em um conjunto de células no tubérculo posterior do diencéfalo ventral (Holzschuh et al., 2001). Esses neurônios representam o sistema dopaminérgico ascendente para o estriado, comparado com o sistema nigroestriatal em humanos (Rink e Wullimann, 2001; 2002). Subsequentemente, os neurônios dopaminérgicos foram

detectados em outras áreas do cérebro do peixe-zebra, como o bulbo olfatório e a retina (Holzschuh et al., 2001). Além disso, os receptores D₁, D₂, D₃ e D₄ foram detectados e encontram-se funcionalmente expressos neste animal (Boehmler et al., 2004; Boehmler et al., 2007).

Estudos mostram que o peixe-zebra apresenta um amplo repertório de comportamentos associados às sinalizações acima citadas, como mudanças na locomoção, preferência condicionada ao lugar e comportamento aditivo quando submetidos a diversos tratamentos, desde fármacos até algumas toxinas, mostrando que este animal é um bom modelo na área toxicológica (Jia et al., 2017; Qiang et al., 2016; Zimmermann et al., 2015; Zhang et al., 2017). Sendo assim, torna-se relevante avaliar o efeito de metais, como o manganês, e agrotóxicos, como diclorvos e tebuconazol, sobre parâmetros comportamentais. Além disso, a avaliação dos sistemas purinérgico, colinérgico e dopaminérgico poderão contribuir para o entendimento dos efeitos neurotóxicos induzidos por estes compostos em peixe-zebra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* 2009; 32: 19-29.
- Abreu MS, Giacomini AC, Gusso D, Koakoski G, Oliveira TA, Marqueze A, Barreto RE, Barcellos LJ. Behavioral responses of zebrafish depend on the type of threatening chemical cues. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* 2016; 202: 895-901.
- Agteresch HJ, Dagnelie PC, van den Berg JW, Wilson JH. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. *Drugs.* 1999; 58: 211-232.
- Alles GA, Hawes RC. Cholinesterase in the blood of man. *J Biol Chem.* 1940; 133: 375-390.
- Altenhofen S, Wiprich MT, Nery LR, Leite CE, Vianna MR, Bonan CD. Manganese(II) chloride alters behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish. *Aquat Toxicol.* 2017; 182: 172-183.
- Altenhofen S, Zimmermann FF, Barreto LS, Bortolotto JW, Kist LW, Bogo MR, Bonan CD. Benzodiazepines alter nucleotide and nucleoside hydrolysis in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *J Neural Transm (Vienna).* 2015; 122: 1077-1088.
- Anagnostaras SG, Murphy GG, Hamilton SE, Mitchell SL, Ahnema NP, Nathanson NM, et al. Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice. *Nat Neurosci.* 2003; 6: 51-58.
- Andersen HR, Nielsen JB, Grandjean P. Toxicologic evidence of developmental neurotoxicity of environmental chemicals. *Toxicology.* 2000; 144: 121-127.
- Andrade TS, Henriques JF, Almeida AR, Machado AL, Koba O, Giang PT, Soares AM, Domingues I. Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos. *Aquat Toxicol.* 2016; 170: 390-399. Erratum in: *Aquat Toxicol.* 2016;173: 228.
- ANVISA, 2009. Consulta Pública nº 61. Brasília: Ministério da Agricultura, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117839/Consulta%2BP%25C3%25BAblica%2Bn%25C2%25BA%2B61.pdf/818dc63d-cf3e-4bbc-a119-7f4efbf314ea>>.

- ANVISA, 2012. Critérios para a classificação Toxicológica. Brasília: Ministério da Agricultura, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/hnN>>.
- Appelbaum L, Skariah G, Mourrain P, Mignot E. Comparative expression of P2X receptors and ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in hypocretin and sensory neurons in zebrafish. *Brain Res.* 2007; 1174: 66-75.
- Arias-Carrión O, Poppel E. Dopamine, learning, and reward-seeking behavior. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2007; 67: 481-488.
- Aschner M, Shanker G, Erikson K, Yang J, Mutkus LA. The uptake of manganese in brain endothelial cultures. *Neurotoxicology.* 2002; 23: 165-168.
- Aschner M, Erikson KM, Dorman DC. Manganese dosimetry: species differences and implications for neurotoxicity. *Crit Rev Toxicol.* 2005; 35: 1-32.
- Aschner M, Guilarte TR, Schneider JS, Zheng W. Manganese: recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007; 221: 131-147.
- Aubert I, Ghorayeb I, Normand E, Bloch B. Phenotypical characterization of the neurons expressing the D1 and D2 dopamine receptors in the monkey striatum. *J Comp Neurol.* 2000; 418: 22-32.
- Augustinsson KB, Nachmansohn D. Distinction between acetylcholine-esterase and other choline ester-splitting enzymes. *Science.* 1949; 110: 98-99.
- Baggio S, Mussulini BH, de Oliveira DL, Zenki KC, Santos da Silva E, Rico EP. Embryonic alcohol exposure promotes long-term effects on cerebral glutamate transport of adult zebrafish. *Neurosci Lett.* 2017; 636: 265-269.
- Bai Q, Burton EA. Zebrafish models of Tauopathy. *Biochim Biophys Acta.* 2011; 1812: 353-363.
- Bajgar J. Organophosphates/nerve agent poisoning: mechanism of action, diagnosis, prophylaxis, and treatment. *Adv Clin Chem.* 2004; 38: 151-216.
- Bakthavatsalam S, Das Sharma S, Sonawane M, Thirumalai V, Datta A. A zebrafish model of manganese reveals reversible and treatable symptoms that are independent of neurotoxicity. *Dis Model Mech.* 2014; 7: 1239-1251.
- Barthold CL, Schier JG. Organic phosphorus compounds--nerve agents. *Crit Care Clin.* 2005; 21: 673-689.

- Battaglin WA, Sandstrom MW, Kuivila KM, Kolpin DW, Meyer MT. Occurrence of azoxystrobin, propiconazole, and selected other fungicides in US streams, 2005–2006. *Water Air Soil Pollut.* 2011; 218: 307-322.
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev.* 2011; 63: 182-217.
- Bellinger D, Leviton A, Waternaux C, Needleman H, Rabinowitz M. Longitudinal analyses of prenatal and postnatal lead exposure and early cognitive development. *N Engl J Med.* 1987; 316: 1037-1043.
- Belloni V, Dessì-Fulgheri F, Zaccaroni M, Di Consiglio E, De Angelis G, Testai E, Santochirico M, Alleva E, Santucci D. Early exposure to low doses of atrazine affects behavior in juvenile and adult CD1 mice. *Toxicology.* 2011; 279: 19-26.
- Bertrand C, Chatonnet A, Takke C, Yan YL, Postlethwait J, Toutant JP, et al. Zebrafish acetylcholinesterase is encoded by a single gene localized on linkage group 7. Gene structure and polymorphism; molecular forms and expression pattern during development. *J Biol Chem.* 2001; 276: 464-474.
- Bianchi E, Lessing G, Brina KR, Angeli L, Andriguetti NB, Peruzzo JR, do Nascimento CA, Spilki FR, Ziulkoski AL, da Silva LB. Monitoring the Genotoxic and Cytotoxic Potential and the Presence of Pesticides and Hydrocarbons in Water of the Sinos River Basin, Southern Brazil. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2017; 72: 321-334.
- Bigonnesse F, Lévesque SA, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJG, et al. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry.* 2004; 43: 5511-5519.
- Binukumar BK, Bal A, Kandimalla R, Sunkaria A, Gill KD. Mitochondrial energy metabolism impairment and liver dysfunction following chronic exposure to dichlorvos. *Toxicology.* 2010; 270: 77-84.
- Binukumar BK, Gill KD. Cellular and molecular mechanisms of dichlorvos neurotoxicity: cholinergic, noncholinergic, cell signaling, gene expression and therapeutic aspects. *Indian J Exp Biol.* 2010; 48: 697-709.
- Binukumar BK, Gupta N, Sunkaria A, Kandimalla R, Wani WY, Sharma DR, Bal A, Gill KD. Protective efficacy of coenzyme Q10 against DDVP-induced cognitive impairments and neurodegeneration in rats. *Neurotox Res.* 2012; 21: 345-357.
- Bjorklund A, Dunnett SB. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* 2007; 30: 194-202.
- Bjørning-Poulsen M, Andersen HR, Grandjean P. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe. *Environ Health.* 2008; 7: 50.

- Boehmler W, Obrecht-Pflumio S, Canfield V, Thisse C, Thisse B, Levenson R Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. *Dev Dyn.* 2004; 230: 481-493.
- Boehmler W, Carr T, Thisse C, Thisse B, Canfield VA, Levendon R. D4 dopamine receptor genes of zebrafish and effects of the antipsychotic clozapine on larval swimming behavior. *Genes Brain Behav.* 2007; 6: 155-166.
- Boehmler W, Petko J, Woll M, Frey C, Thisse B, Thisse C, et al. Identification of zebrafish A2 adenosine receptors and expression in developing embryos. *Gene Expr Patterns.* 2009; 9: 144-151.
- Bonan CD, Amaral OB, Rockenbach IC, Walz R, Battastini AM, Izquierdo I, Sarkis JJ. Altered ATP hydrolysis induced by pentylentetrazol kindling in rat brain synaptosomes. *Neurochem Res.* 2000; 25: 775-779.
- Bonan CD. Ectonucleotidases and nucleotide/nucleoside transporters as pharmacological targets for neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2012; 11: 739-750.
- Bortolotto JW, Cognato GP, Christoff RR, Roesler LN, Leite CE, Kist LW, Bogo MR, Vianna MR, Bonan CD. Long-term exposure to paraquat alters behavioral parameters and dopamine levels in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish.* 2014; 11: 142-53.
- Bowler RM, Gocheva V, Harris M, Ngo L, Abdelouahab N, Wilkinson J, Doty RL, Park R, Roels HA. Prospective study on neurotoxic effects in manganese-exposed bridge construction welders. *Neurotoxicology.* 2011; 32: 596-605.
- Bowton E, Saunders C, Erreger K, Sakrikar D, Matthies HJ, Sen N, Jessen T, Colbran RJ, Caron MG, Javitch JA, Blakely RD, Galli A. Dysregulation of dopamine transporters via dopamine D2 autoreceptors triggers anomalous dopamine efflux associated with attention-deficit hyperactivity disorder. *J Neurosci.* 2010; 30: 6048-6057.
- Brown DA. Acetylcholine. *Br J Pharmacol.* 2006; 147: S120-S126.
- Burnstock, G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev.* 1972; 24: 509-581.
- Burnstock G. Purinergic receptors. *J Theor Biol.* 1976; 62: 491-503.
- Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2 purinoceptor? *Gen Pharmacol.* 1985; 16: 433-440.
- Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol.* 2004; 240: 231-304.
- Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 12: 1471-1483.

- Burnstock G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov.* 2008; 7: 575-590.
- Burnstock G, Verkhratsky A. Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta Physiol (Oxf).* 2009; 195: 415-447.
- Burnstock G. Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. *Bioessays.* 2012; 34: 218-225.
- Burton NC, Guilarte TR. Manganese neurotoxicity: lessons learned from longitudinal studies in nonhuman primates. *Environ Health Perspect.* 2009; 117: 325-332.
- Buske C, Gerlai R. Maturation of shoaling behavior is accompanied by changes in the dopaminergic and serotonergic systems in zebrafish. *Dev Psychobiol.* 2012; 54: 28-35.
- Butterworth J. Changes in nine enzyme markers for neurons, glia, and endothelial cells in agonal state and Huntington's disease caudate nucleus. *J Neurochem.* 1986; 47: 583-587.
- Bymaster FP, McKinzie DL, Felder CC, Wess J. Use of M1–M5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to delineate the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. *Neurochem Res.* 2003; 28: 437-442.
- Caldas SS, Bolzan CM, Guilherme JR, Silveira MA, Escarrone AL, Primel EG. Determination of pharmaceuticals, personal care products, and pesticides in surface and treated waters: method development and survey. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2013; 20: 5855-5863.
- Canzian J, Fontana BD, Quadros VA, Rosemberg DB. Conspecific alarm substance differently alters group behavior of zebrafish populations: Putative involvement of cholinergic and purinergic signaling in anxiety- and fear-like responses. *Behav Brain Res.* 2017; 320: 255-263.
- Capiotti KM, Menezes FP, Nazario LR, Pohlmann JB, de Oliveira GM, Fazenda L, Bogo MR, Bonan CD, Da Silva RS. Early exposure to caffeine affects gene expression of adenosine receptors, DARPP-32 and BDNF without affecting sensibility and morphology of developing zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol Teratol.* 2011; 33: 680-685.
- Carús-Cadavieco M, de Andrés I. Adenosina y control homeostático del sueño. Acciones en estructuras diana de los circuitos de vigilia y sueño. *Rev Neurol.* 2012; 55: 413-420.
- Casadó-Anguera V, Bonaventura J, Moreno E, Navarro G, Cortés A, Ferré S, Casadó V. Evidence for the heterotetrameric structure of the adenosine A2A-dopamine D2 receptor complex. *Biochem Soc Trans.* 2016; 44: 595-600.

- Castillo PE, Carleton A, Vincent JD, Lledo PM. Multiple and opposing roles of cholinergic transmission in the main olfactory bulb. *J Neurosci*. 1999; 19: 9180-9191.
- Chen W, Guidotti G. Soluble apyrases release ADP during ATP hydrolysis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 282: 90-95.
- Ciliax BJ, Heilman C, Demchyshyn LL, Pristupa ZB, Ince E, Hersch SM, Niznik HB, Levey AI. The dopamine transporter: immunochemical characterization and localization in brain. *J Neurosci*. 1995; 15: 1714-1723.
- Ciliax BJ, Drash GW, Staley JK, Haber S, Mobley CJ, Miller GW, Mufson EJ, Mash DC, Levey AI. Immunocytochemical localization of the dopamine transporter in human brain. *J Comp Neurol*. 1999; 409: 38-56.
- Coggon D. Work with pesticides and organophosphate sheep dips. *Occup Med (Lond)*. 2002; 52: 467-470.
- Cognato GP, Bonan CD. Ectonucleotidases and Epilepsy. *The Open Neuroscience Journal*. 2010 ; 4 : 44-52.
- Colović MB, Krstić DZ, Lazarević-Pašti TD, Bondžić AM, Vasić VM. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol*. 2013; 11: 315-335.
- CONAMA. Resolução Nº 357, de 17 de março de 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>
- Cortese L, Caligiuri MP, Malla AK, Manchanda R, Takhar J, Haricharan R. Relationship of neuromotor disturbances to psychosis symptoms in first-episode neuroleptic-naive schizophrenia patients. *Schizophr Res*. 2005; 75: 65-75.
- Corti F, Cellai L, Melani A, Donati C, Bruni P, Pedata F. Adenosine is present in rat brain synaptic vesicles. *Neuroreport*. 2013; 24: 982-987.
- Cotzias GC, Greenough JJ. The high specificity of the manganese pathway through the body. *J Clin Invest*. 1958; 37: 1298-1305.
- Cunha RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int*. 2001; 38: 107-125.
- Cunha RA, Ribeiro JA. ATP as a presynaptic modulator. *Life Sci*. 2000; 68: 119-37.
- De Wilde T, Spanoghe P, Debaer C, Ryckeboer J, Springael D, Jaeken P. Overview of on-farm bioremediation systems to reduce the occurrence of point source contamination. *Pest Manag Sci*. 2007; 63: 111-128.

- Debes F, Budtz-Jørgensen E, Weihe P, White RF, Grandjean P. Impact of prenatal methylmercury exposure on neurobehavioral function at age 14 years. *Neurotoxicol Teratol.* 2006; 28: 363-375.
- Daly JW. Adenosine receptors. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* 1985; 19: 29-46.
- Descarries L, Gisiger V, Steriade M. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Prog Neurobiol.* 1997; 53: 603-325.
- De Rosa E, Hasselmo ME. Muscarinic cholinergic neuromodulation reduces proactive interference between stored odor memories during associative learning in rats. *Behav Neurosci.* 2000; 114: 32-41.
- Díaz-Hernandez M, Pintor J, Castro E, Miras-Portugal MT. Co-localisation of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals. *Neuropharmacology.* 2002; 24: 20-33.
- Dreosti E, Lopes G, Kampff AR, Wilson SW. Development of social behavior in young zebrafish. *Front Neural Circuits.* 2015; 9:39.
- Edwards JG, Greig A, Sakata Y, Elkin D, Michel WC. Cholinergic innervation of the zebrafish olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 2007; 504: 631-645.
- Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch.* 2006; 452: 552-562.
- Erikson KM, Aschner M. Manganese neurotoxicity and glutamate-GABA interaction. *Neurochem Int.* 2003; 43: 475-480.
- Erikson KM, Syversen T, Aschner JL, Aschner M. Interactions between excessive manganese exposures and dietary iron-deficiency in neurodegeneration. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2005a; 19: 415-421.
- Erikson KM, John CE, Jones SR, Aschner M. Manganese accumulation in striatum of mice exposed to toxic doses is dependent upon a functional dopamine transporter. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2005b; 20: 390-394.
- Eskenazi B, Bradman A, Castorina R. Exposures of children to organophosphate pesticides and their potential adverse health effects. *Environ Health Perspect.* 1999; 107(Suppl 3): 409-419.
- Faustman EM, Silbernagel SM, Fenske RA, Burbacher TM, Ponce RA. Mechanisms underlying children's susceptibility to environmental toxicants. *Environ Health Perspect.* 2000; 108(Suppl 1): 13-21.

- Fernandez HL, Hodges-Savola CA. Trophic regulation of acetylcholinesterase isoenzymes in adult mammalian skeletal muscles. *Neurochem Res.* 1992; 17: 115-124.
- Ferré S, Bonaventura J, Tomasi D, Navarro G, Moreno E, Cortés A, Lluís C, Casadó V, Volkow ND. Allosteric mechanisms within the adenosine A2A-dopamine D2 receptor heterotetramer. *Neuropharmacology.* 2016; 104: 154-160.
- Fields RD, Burnstock G. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7: 423-436.
- Filipov NM, Lawrence DA. Developmental toxicity of a triazole fungicide: consideration of interorgan communication. *Toxicol Sci.* 2001; 62: 185-186.
- Finkelstein MM, Jerrett M. A study of the relationships between Parkinson's disease and markers of traffic-derived and environmental manganese air pollution in two Canadian cities. *Environ Res.* 2007; 104: 420-432.
- Finkelstein Y, Milatovic D, Aschner M. Modulation of cholinergic systems by manganese. *Neurotoxicology.* 2007; 28: 1003-1014.
- Fismes J, Perrin-Ganier C, Empereur-Bissonnet P, Morel JL. Soil-to-root transfer and translocation of polycyclic aromatic hydrocarbons by vegetables grown on industrial contaminated soils. *J Environ Qual.* 2002; 31:1649-1656.
- Florán B, Barajas C, Florán L, Erlij D, Aceves J. Adenosine A1 receptors control dopamine D1-dependent [(3)H]GABA release in slices of substantia nigra pars reticulata and motor behavior in the rat. *Neuroscience.* 2002; 115: 743-751.
- Franco R, Casadó V, Ciruela F, Saura C, Mallol J, Canela EI, Lluís C. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog Neurobiol.* 1997; 52: 283-294.
- Franco R, Li S, Rodriguez-Rocha H, Burns M, Panayiotidis MI. Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. *Chem Biol Interact.* 2010; 188: 289-300.
- Fredholm BB, Dunwiddie TV. How does adenosine inhibit transmitter release? *Trends Pharmacol Sci.* 1988; 9: 130-134.
- Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wasserman W. Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2000; 362: 364-374.
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev.* 2001; 53: 527-552.

- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Müller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors--an update. *Pharmacol Rev.* 2011; 63: 1-34.
- Geffard M, McRae-Degueurce A, Souan ML. Immunocytochemical detection of acetylcholine in the rat central nervous system. *Science.* 1985; 229: 77-79.
- Gerfen CR, Keefe KA, Gauda EB. D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons. *J Neurosci.* 1995; 15: 8167-8176.
- Ghatpande AS, Sivaraaman K, Vijayaraghavan S. Store calcium mediates cholinergic effects on mIPSCs in the rat main olfactory bulb. *J Neurophysiol.* 2006; 95: 1345-1355.
- GIAIA. Relatório Técnico: Determinação de metais na bacia do Rio Doce (período: dezembro-2015 a abril-2016). Grupo Independente para Avaliação de Impacto Ambiental. Disponível em: < http://giaia.eco.br/wp-content/uploads/2016/06/Relatorio-GIAIA_Metais_Vivian_revisto5.pdf>
- Goldman-Rakic PS. The cortical dopamine system: role in memory and cognition. *Adv Pharmacol.* 1998; 42: 707-711.
- González RR, Fernández RF, Vidal JL, Frenich AG, Pérez ML. Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass-spectrometry (UHPLC MS/MS) method for the simultaneous determination of neurotransmitters in rat brain samples. *J Neurosci Methods.* 2011; 198: 187-194.
- Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Kortsha GX, Brown GG, Richardson RJ. Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the risk of Parkinson's disease. *Neurotoxicology.* 1999; 20: 239-247.
- Grandjean P, Landrigan PJ. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet.* 2006; 368: 2167-2178.
- Green WN, Millar NS. Ion-channel assembly. *Trends Neurosci.* 1995; 18: 280-287.
- Gregory M, Jagadeeswaran P. Selective labeling of zebrafish thrombocytes: quantitation of thrombocytes function and deletion during development. *Blood Cells Mol Dis.* 2002; 29: 286-295.
- Guilarte TR. Manganese and Parkinson's disease: a critical review and new findings. *Environ Health Perspect.* 2010; 118: 1071-1080.

- Gurevich EV, Joyce JN. Distribution of dopamine D3 receptor expressing neurons in the human forebrain: comparison with D2 receptor expressing neurons. *Neuropsychopharmacology*. 1999; 20: 60-80.
- Han P, Nakanishi ST, Tran MA, Whelan PJ. Dopaminergic modulation of spinal neuronal excitability. *J Neurosci*. 2007; 27: 13192-13204.
- Harangi S, Baranyai E, Fehér M, Tóth CN, Herman P, Stündl L, Fábíán I, Tóthmérész B, Simon E. Accumulation of Metals in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*) Exposed to Sublethal Levels of Iron and Manganese: Survival, Body Weight and Tissue. *Biol Trace Elem Res*. 2017; 177: 187-195.
- Harford AJ, Mooney TJ, Trenfield MA, van Dam RA. Manganese toxicity to tropical freshwater species in low hardness water. *Environ Toxicol Chem*. 2015; 34: 2856-2863.
- Haskó G, Kuhel DG, Németh ZH, Mabley JG, Stachlewitz RF, Virág L, Lohinai Z, Southan GJ, Salzman AL, Szabó C. Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. *J Immunol*. 2000; 164: 1013-1019.
- Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol*. 2006; 16: 710-715.
- Haverroth GM, Welang C, Mocelin RN, Postay D, Bertoncetto KT, Franscescon F, Rosemberg DB, Dal Magro J, Dalla Corte CL. Copper acutely impairs behavioral function and muscle acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol Environ Saf*. 2015; 122: 440-447.
- Heller M, Hanahan DJ. Human erythrocyte membrane bound enzyme acetylcholinesterase. *Biochim Biophys Acta*. 1972; 17: 251-272.
- Hirata Y. Manganese-induced apoptosis in PC12 cells. *Neurotoxicol Teratol*. 2002; 24:639-653.
- Hirata Y, Adachi K, Kiuchi K. Activation of JNK pathway and induction of apoptosis by manganese in PC12 cells. *J Neurochem*. 1998; 71: 1607-1615.
- Hirsch EC. Why are nigral catecholaminergic neurons more vulnerable than other cells in Parkinson's disease? *Ann Neurol*. 1992; 32: S88-S93.
- Hirschhorn R, Ratech H. Isozymes of adenosine deaminase. *Isozymes Curr Top Biol Med Res*. 1980; 4: 131-157.
- Hoebertz A, Arnett TR, Burnstock G. Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. *Trends Pharmacol Sci*. 2003; 24: 290-297.

- Holzschuh J, Ryu S, Aberger F, Driever W. Dopamine transporter expression distinguishes dopaminergic neurons from other catecholaminergic neurons in the developing zebrafish embryo. *Mech Dev.* 2001; 101: 237-243.
- Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C., et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature.* 2013; 496: 498-503.
- Hu H, Téllez-Rojo MM, Bellinger D, Smith D, Ettinger AS, Lamadrid-Figueroa H, Schwartz J, Schnaas L, Mercado-García A, Hernández-Avila M. Fetal lead exposure at each stage of pregnancy as a predictor of infant mental development. *Environ Health Perspect.* 2006; 114: 1730-1735.
- Hudnell HK. Effects from environmental Mn exposures: a review of the evidence from non-occupational exposure studies. *Neurotoxicology.* 1999; 20: 379-397.
- Huizink AC, Mulder EJ. Maternal smoking, drinking or cannabis use during pregnancy and neurobehavioral and cognitive functioning in human offspring. *Neurosci Biobehav Rev.* 2006; 30: 24-41.
- Hurley MJ, Stubbs CM, Jenner P, Marsden CD. D3 receptor expression within the basal ganglia is not affected by Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 1996; 214: 75-78.
- Hurley MJ, Mash DC, Jenner P. Markers for dopaminergic neurotransmission in the cerebellum in normal individuals and patients with Parkinson's disease examined by RT-PCR. *Eur J Neurosci.* 2003; 18: 2668-2672.
- Hurley MJ, Jenner P. What has been learnt from study of dopamine receptors in Parkinson's disease? *Pharmacol Ther.* 2006; 111: 715-728.
- IARC. Occupational exposures in insecticides application, and some pesticides; Dichlorvos. In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* (Lyon, France: IARC, World Health Organization). 1991, 267 p.
- Iversen SD, Iversen LL. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci.* 2007; 30: 188-193.
- Jantzen CE, Annunziato KA, Bugel SM, Cooper KR. PFOS, PFNA, and PFOA sub-lethal exposure to embryonic zebrafish have different toxicity profiles in terms of morphometrics, behavior and gene expression. *Aquat Toxicol.* 2016a; 175: 160-170.
- Jantzen CE, Annunziato KM, Cooper KR. Behavioral, morphometric, and gene expression effects in adult zebrafish (*Danio rerio*) embryonically exposed to PFOA, PFOS, and PFNA. *Aquat Toxicol.* 2016b; 180: 123-130.

- Jia L, Raghupathy RK, Albalawi A, Zhao Z, Reilly J, Xiao Q, Shu X. A colour preference technique to evaluate acrylamide-induced toxicity in zebrafish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2017; pii: S1532-0456(17)30004-2.
- Jokanovic M. Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides. *Toxicol Lett*. 2009; 190: 107-115.
- Jones DC, Miller GW. The effects of environmental neurotoxicants on the dopaminergic system: A possible role in drug addiction. *Biochem Pharmacol*. 2008; 76: 569-581.
- Julvez J, Ribas-Fitó N, Torrent M, Fornis M, Garcia-Esteban R, Sunyer J. Maternal smoking habits and cognitive development of children at age 4 years in a population-based birth cohort. *Int J Epidemiol*. 2007; 36: 825-832.
- Julvez J, Grandjean P. Neurodevelopmental toxicity risks due to occupational exposure to industrial chemicals during pregnancy. *Ind Health*. 2009; 47: 459-468.
- Kachaiyaphum P, Howteerakul N, Sujirarat D, Siri S, Suwannapong N. Serum cholinesterase levels of Thai chilli-farm workers exposed to chemical pesticides: prevalence estimates and associated factors. *J Occup Health*. 2010; 52: 89-98.
- Karanasios E, Tsiropoulos NG, Karpouzas DG. On-farm biopurification systems for the deputation of pesticide wastewaters: recent biotechnological advances and future perspectives. *Biodegradation*. 2012; 23: 787-802.
- Kaufman S, Friedman S. Dopamine-beta-hydroxylase. *Pharmacol Rev*. 1965; 17: 71-100.
- Keen CL, Lönnerdal B, Clegg M, Hurley LS. Developmental changes in composition of rat milk: trace elements, minerals, protein, carbohydrate and fat. *J Nutr*. 1981; 111: 226-236.
- Keen CL, Bell JG, Lönnerdal B. The effect of age on manganese uptake and retention from milk and infant formulas in rats. *J Nutr*. 1986; 116: 395-402.
- Keen CL, Ensunsa JL, Watson MH, Baly DL, Donovan SM, Monaco MH, Clegg MS. Nutritional aspects of manganese from experimental studies. *Neurotoxicology*. 1999; 20: 213-223.
- Khan ZU, Gutiérrez A, Martín R, Peñafiel A, Rivera A, de la Calle A. Dopamine D5 receptors of rat and human brain. *Neuroscience*. 2000; 100: 689-699.
- Kienle C, Köhler HR, Gerhardt A. Behavioural and developmental toxicity of chlorpyrifos and nickel chloride to zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2009; 72: 1740-1747.

- Kim Y, Kim JM, Kim JW, Yoo CI, Lee CR, Lee JH, Kim HK, Yang SO, Chung HK, Lee DS, Jeon B. Dopamine transporter density is decreased in parkinsonian patients with a history of manganese exposure: what does it mean? *Mov Disord.* 2002; 17: 568-575.
- Kim Y, Bowler RM, Abdelouahab N, Harris M, Gocheva V, Roels HA. Motor function in adults of an Ohio community with environmental manganese exposure. *Neurotoxicology.* 2011; 32: 606-614.
- King AE, Ackley MA, Cass CE, Young JD, Baldwin SA. Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci.* 2006; 27: 416-425.
- Kirischuk S, Moller T, Voitenko N, Kettenmann H, Verkhratsky A. ATP-induced cytoplasmic calcium mobilization in Bergmann glial cells. *J Neurosci.* 1995a; 15: 7861-7871.
- Kirischuk S, Scherer J, Kettenmann H, Verkhratsky A. Activation of P2-purinoreceptors triggered Ca²⁺ release from InsP3-sensitive internal stores in mammalian oligodendrocytes. *J Physiol (Lond).* 1995b; 483: 41-57.
- Kluge H, Hartmenn W, Wiczorek V, Zahlten W, Gröschel W. Kinetic properties of cerebral 5'-nucleotidase. *J Neurochem.* 1972; 19: 1409-1411.
- Krachler M, Rossipal E. Concentrations of trace elements in extensively hydrolysed infant formulae and their estimated daily intakes. *Ann Nutr Metab.* 2000; 44: 68-74.
- Kucenas S, Li Z, Cox JA, Egan TM, Voigt MM. Molecular characterization of the zebrafish P2X receptor subunit gene family. *Neuroscience.* 2003; 121: 935-945.
- Kwok IM-Y, Leoffler R. The biochemical mode of action of some newer azole fungicides. *Pestic Sci.* 1993; 39: 1-11.
- Lamb DC, Kelly DE, Manning NJ, Hollomon DW, Kelly SL. Expression, purification, reconstitution and inhibition of *Ustilago maydis* sterol 14 alpha-demethylase (CYP51; P450(14DM)). *FEMS Microbiol Lett.* 1998; 169: 369-373.
- Lander F, Kristiansen J, Lauritsen JM. Manganese exposure in foundry furnacemen and scrap recycling workers. *Int Arch Occup Environ Health.* 1999; 72: 546-550.
- Langheinrich U. Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk. *Bioessays.* 2003; 25: 904-912.
- Lapish CC, Kroener S, Durstewitz D, Lavin A, Seamans JK. The ability of the mesocortical dopamine system to operate in distinct temporal modes. *Psychopharmacology (Berl).* 2007; 191: 609-625.

- Łebkowska M, Zaleska-Radziwiłł M, Rutkowska-Narozniak A, Kobiela S. Toxicity assessment of wood preservatives. *Environ Int.* 2003; 28: 801-802.
- Leite CE, Maboni LO, Cruz FF, Rosemberg DB, Zimmermann FF, Pereira TC, Bogo MR, Bonan CD, Campos MM, Morrone FB, Battastini AM. Involvement of purinergic system in inflammation and toxicity induced by copper in zebrafish larvae. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013; 272:681-689.
- Levin EY, Levenberg B, Kaufman S. The enzymatic conversion of 3,4-dihydroxyphenylethylamine to norepinephrine. *J Biol Chem.* 1960; 235: 2080-2086.
- Liao SL, Chen CJ. Manganese stimulates stellation of cultured rat cortical astrocytes. *Neuroreport.* 2001; 12: 3877-3881.
- Libert F, Parmentier M, Lefort A, Dinsart C, Van Sande J, Maenhaut C, Simons M-J, Dumont JE, Vassart G. Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family. *Science.* 1989; 244: 569-572.
- Liccione JJ, Maines MD. Manganese-mediated increase in the rat brain mitochondrial cytochrome P-450 and drug metabolism activity: susceptibility of the striatum. *J Pharmacol Exp Ther.* 1989; 248: 222-228.
- Linster C, Garcia PA, Hasselmo ME, Baxter MG. Selective loss of cholinergic neurons projecting to the olfactory system increases perceptual generalization between similar, but not dissimilar, odorants. *Behav Neurosci.* 2001; 115: 826-833.
- Liu Z, Wang Y, Zhu Z, Yang E, Feng X, Fu Z, Jin Y. Atrazine and its main metabolites alter the locomotor activity of larval zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere.* 2016; 148: 163-170.
- Londres F. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. Rio de Janeiro: ASPTA - Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa. 2011; 190 p.
- López-Cruz L, Carbó-Gas M, Pardo M, Bayarri P, Valverde O, Ledent C, Salamone JD, Correa M. Adenosine A(2A) receptor deletion affects social behaviors and anxiety in mice: Involvement of anterior cingulate cortex and amygdala. *Behav Brain Res.* 2016; 321: 8-17.
- Lucchini R, Bergamaschi E, Smargiassi A, Festa D, Apostoli P. Motor function, olfactory threshold, and hematological indices in manganese-exposed ferroalloy workers. *Environ Res.* 1997; 73: 175-180.
- Lucchini RG, Martin CJ, Doney BC. From manganism to manganese-induced parkinsonism: a conceptual model based on the evolution of exposure. *Neuromolecular Med.* 2009; 11: 311-321.

- Lutte AH, Capiotti KM, da Silva NL, da Silva CS, Kist LW, Bogo MR, Da Silva RS. Contributions from extracellular sources of adenosine to the ethanol toxicity in zebrafish larvae. *Reprod Toxicol*. 2015; 53: 82-91.
- Ma X, Han J, Wu Q, Liu H, Shi S, Wang C, Wang Y, Xiao J, Zhao J, Jiang J, Wan C. Involvement of dysregulated Wip1 in manganese-induced p53 signaling and neuronal apoptosis. *Toxicol Lett*. 2015; 235: 17-27.
- Maenhaut C, Van Sande J, Libert F, Abramowicz M, Parmentier M, Vanderhaegen JJ, Dumont JE, Vassart G, Schiffmann S. RDC8 codes for an adenosine A2 receptor with physiological constitutive activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990; 173: 1169-1178.
- Maier SA, Galellis JR, McDermid HE. Phylogenetic analysis reveals a novel protein family closely related to adenosine deaminase. *J Mol Evol*. 2005; 61: 776-794.
- Massoulié J, Perrier N, Noureddine H, Liang D, Bon S. Old and new questions about cholinesterases. *Chem Biol Interact*. 2008; 175: 30-44.
- Marcon M, Herrmann AP, Mocelin R, Rambo CL, Koakoski G, Abreu MS, Conterato GM, Kist LW, Bogo MR, Zanatta L, Barcellos LJ, Piato AL. Prevention of unpredictable chronic stress-related phenomena in zebrafish exposed to bromazepam, fluoxetine and nortriptyline. *Psychopharmacology (Berl)*. 2016; 233: 3815-3824.
- Maximino C, Lima MG, Olivera KR, Picanço-Diniz DL, Herculano AM. Adenosine A1, but not A2, receptor blockade increases anxiety and arousal in Zebrafish. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011; 109: 203-207.
- McMillan DE. A brief history of the neurobehavioral toxicity of manganese: some unanswered questions. *Neurotoxicology*. 1999; 20: 499-507.
- Melani A, Corti F, Stephan H, Müller CE, Donati C, Bruni P, Vannucchi MG, Pedata F. Ecto-ATPase inhibition: ATP and adenosine release under physiological and ischemic in vivo conditions in the rat striatum. *Exp Neurol*. 2012; 233: 193-204.
- Mendel B, Mundell DB, Rudney H. Studies on cholinesterase: 3. Specific tests for true cholinesterase and pseudo-cholinesterase. *Biochem J*. 1943; 37: 473-476.
- Mergler D, Baldwin M. Early manifestations of manganese neurotoxicity in humans: an update. *Environ Res*. 1997; 73: 92-100.
- Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen EG, Lockridge O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience*. 2002; 110: 627-639.

- Millar NS, Harkness PC. Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholinereceptors. *Mol Memb Biol.* 2008; 25, 279-292.
- Millar NS; Gotti C. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology.* 2009; 56: 237-246.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 1998; 78: 189-225.
- Molinoff PB, Axelrod J. Biochemistry of catecholamines. *Annu Rev Biochem.* 1971; 40: 465-500.
- Moller T, Kann O, Verkhatsky A, Kettenmann H. Activation of mouse microglial cells affects P2 receptor signaling. *Brain Res.* 2000; 853: 49-59.
- Montagner CC, Vidal C, Acayaba RD, Jardim WF, Jardim ICSF, Umbuzeiro GA. Trace analysis of pesticides and an assessment of their occurrence in surface and drinking waters from the State of São Paulo (Brazil). *Anal Methods.* 2014; 6: 6668-6677.
- Moore MT, Lizotte RE Jr, Smith S Jr. Toxicity evaluation of diazinon contaminated leaf litter. *Bull Environ Contam Toxicol.* 200; 78: 168-171.
- Morello M, Canini A, Mattioli P, Sorge RP, Alimonti A, Bocca B, Forte G, Martorana A, Bernardi G, Sancesario G. Sub-cellular localization of manganese in the basal ganglia of normal and manganese-treated rats An electron spectroscopy imaging and electron energy-loss spectroscopy study. *Neurotoxicology.* 2008; 29: 60-72.
- Morris DR, Levenson CW. Zinc in traumatic brain injury: from neuroprotection to neurotoxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2013.
- Moser VC, Barone S Jr, Smialowicz RJ, Harris MW, Davis BJ, Overstreet D, Mauney M, Chapin RE. The effects of perinatal tebuconazole exposure on adult neurological, immunological, and reproductive function in rats. *Toxicol Sci.* 2001; 62: 339-352.
- Murphy PC, Sillito AM. Cholinergic enhancement of direction selectivity in the visual cortex of the cat. *Neuroscience.* 1991; 40: 13-20.
- Najamuddin, Prartono T, Sanusi HS, Nurjaya IW. Seasonal distribution and geochemical fractionation of heavy metals from surface sediment in a tropical estuary of Jeneberang River, Indonesia. *Mar Pollut Bull.* 2016; 111: 456-462.
- Nazario LR, Antonioli R Jr, Capiotti KM, Hallak JE, Zuardi AW, Crippa JA, Bonan CD, da Silva RS. Caffeine protects against memory loss induced by high and non-anxiolytic dose of cannabidiol in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacol Biochem Behav.* 2015; 135: 210-216.

- Ning J, Gang G, Bai Z, Hu Q, Qi H, Ma A, Zhuan X, Zhuang G. In situ enhanced bioremediation of dichlorvos by a phyllosphere *Flavobacterium* strain. *Front Environ Sci Engin.* 2012; 6: 231-237.
- Normandin L, Ann Beupré L, Salehi F, St -Pierre A, Kennedy G, Mergler D, Butterworth RF, Philippe S, Zayed J. Manganese distribution in the brain and neurobehavioral changes following inhalation exposure of rats to three chemical forms of manganese. *Neurotoxicology.* 2004; 25: 433-441.
- North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev.* 2002; 82: 1013-1067.
- North RA, Verkhratsky A. Purinergic transmission in the central nervous system. *Pflugers Arch.* 2006; 452: 479-485.
- Norton WH, Rohr KB, Burnstock G. Embryonic expression of P2X(3) receptor encoding gene in zebrafish. *Mech Dev.* 2000; 9: 149-152.
- Oberlander C, Euvrard C, Dumont C, Boissier JR. Circling behaviour induced by dopamine releasers and/or uptake inhibitors during degeneration of the nigrostriatal pathway. *Eur J Pharmacol.* 1979; 60: 163-170.
- Oda Y. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Intl.* 1999; 49: 921-937.
- Okuda T, Haga T, Kanai Y, Endou H, Ishihara T, Katsura I. Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat Neurosci.* 2000; 3: 120-125.
- Olanow CW, Good PF, Shinotoh H, Hewitt KA, Vingerhoets F, Snow BJ, Beal MF, Calne DB, Perl DP. Manganese intoxication in the rhesus monkey: a clinical, imaging, pathologic, and biochemical study. *Neurology.* 1996; 46: 492-498.
- Olanow CW. Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1012: 209-223.
- Oliveira FA, Reis LP, Soto-Blanco B, Melo MM. Pesticides residues in the *Prochilodus costatus* (Valenciennes, 1850) fish caught in the São Francisco River, Brazil. *J Environ Sci Health B.* 2015; 50: 398-405.
- Oliveira GM, Kist LW, Pereira TC, Bortolotto JW, Paquete FL, de Oliveira EM, Leite CE, Bonan CD, de Souza Basso NR, Papaleo RM, Bogo MR. Transient modulation of acetylcholinesterase activity caused by exposure to dextran-coated iron oxide nanoparticles in brain of adult zebrafish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2014; 162: 77-84.
- Pal PK, Samii A, Calne DB. Manganese neurotoxicity: a review of clinical features, imaging and pathology. *Neurotoxicology.* 1999; 20: 227-238.

- Park EJ, Lee YK, Kim YJ, Lee CJ. Cholinergic modulation of neural activity in the telencephalon of the zebrafish. *Neurosci Lett*. 2008; 439: 79-83.
- Pereira VM, Bortolotto JW, Kist LW, Azevedo MB, Fritsch RS, Oliveira Rda L, Pereira TC, Bonan CD, Vianna MR, Bogo MR. Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology*. 2012; 33: 469-475.
- Peter JV, Jerobin J, Nair A, Bennett A. Is there a relationship between the WHO hazard classification of organophosphate pesticide and outcomes in suicidal human poisoning with commercial organophosphate formulations? *Regul Toxicol Pharmacol*. 2010; 57: 99-102.
- Picciotto MR, Zoli M, Rimondini R, Lena C, Marubio LM, Pich EM, et al. Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature*. 1998; 391: 173-177.
- Pinheiro AS, Rocha GO, Andrade JB. A SDME/GC–MS methodology for determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water. *Microchem J*. 2011; 99: 303-308.
- Pletsa V, Steenwinkel MJ, van Delft JH, Baan RA, Kyrtopoulos SA. Induction of somatic mutations but not methylated DNA adducts in lambda lacZ transgenic mice by dichlorvos. *Cancer Lett*. 1999; 146: 155-160.
- Porkka-Heiskanen T. Adenosine in sleep and wakefulness. *Ann Med*. 1999; 31: 125-129.
- Prediger RD, De-Mello N, Takahashi RN. Pilocarpine improves olfactory discrimination and social recognition memory deficits in 24 month-old rats. *Eur J Pharmacol*. 2006; 531: 176-182.
- Primus RJ, Thurkauf A, Xu J, Yevich E, McInerney S, Shaw K, Tallman JF, Gallagher DW. II. Localization and characterization of dopamine D4 binding sites in rat and human brain by use of the novel, D4 receptor-selective ligand [3H]NGD 94-1. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997; 282: 1020-1027.
- Qian ZM, Wang Q. Expression of iron transport proteins and excessive iron accumulation in the brain in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev*. 1998; 27: 257-267.
- Qiang L, Cheng J, Yi J, Rotchell JM, Zhu X, Zhou J. Environmental concentration of carbamazepine accelerates fish embryonic development and disturbs larvae behavior. *Ecotoxicology*. 2016; 25: 1426-1437.
- Radev Z, Hermel JM, Elipot Y, Bretaud S, Arnould S, Duchateau P, Ruggiero F, Joly JS, Sohm F. A TALEN-Exon Skipping Design for a Bethlem Myopathy Model in Zebrafish. *PLoS One*. 2015; 10: e0133986.

- Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998; 50: 413-492.
- Rambo CL, Mocelin R, Marcon M, Villanova D, Koakoski G, de Abreu MS, Oliveira TA, Barcellos LJ, Piato AL, Bonan CD. Gender differences in aggression and cortisol levels in zebrafish subjected to unpredictable chronic stress. *Physiol Behav.* 2016; 171: 50-54.
- Rathbone MP, Middlemiss PJ, Gysbers JW, Andrew C, Herman MA, Reed JK, Ciccarelli R, Di Iorio P, Caciagli F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol.* 1999; 59: 663-690.
- Ravel N, Elaagouby A, Gervais R. Scopolamine injection into the olfactory bulb impairs short-term olfactory memory in rats. *Behav Neurosci.* 1994; 108: 317-324.
- Rebecchi MJ, Pentylala SN. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev.* 2000; 80: 1291-1335.
- Rehnberg GL, Hein JF, Carter SD, Linko RS, Laskey JW. Chronic ingestion of Mn₃O₄ by rats: tissue accumulation and distribution of manganese in two generations. *J Toxicol Environ Health.* 1982; 9: 175-188.
- Ribeiro JA, Sebastiao AM, Mendonca A. Participation of adenosine receptors in neuroprotection. *Drug News Perspect.* 2003; 16: 80-86.
- Rice D, Barone S Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect.* 2000; 108: 511-533.
- Richendrer H, Creton R. Chlorpyrifos and malathion have opposite effects on behaviors and brain size that are not correlated to changes in AChE activity. *Neurotoxicology.* 2015; 49: 50-58.
- Richendrer H, Pelkowski SD, Colwill RM, Créton R. Developmental sub-chronic exposure to chlorpyrifos reduces anxiety-related behavior in zebrafish larvae. *Neurotoxicol Teratol.* 2012; 34: 458-465.
- 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.* 2003; 73: 2071-2082.
- Rico EP, Rosemberg DB, Senger MR, Arizi MB, Bernardi GF, Dias RD, et al. Methanol alters ecto-nucleotidases and acetylcholinesterase in zebrafish brain. *Neurotoxicol Teratol.* 2006; 28: 489-496.
- Rico EP, Rosemberg DB, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. *Toxicol Lett.* 2007; 174: 25-30.

- Rico EP, Rosemberg DB, Seibt KJ, Capiotti KM, Da Silva RS, Bonan CD. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicol Teratol.* 2011; 33: 608-617.
- Rink E, Wullimann MF. The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum). *Brain Research.* 2001; 889: 316-330.
- Rink E, Wullimann MF. Connections of the ventral telencephalon and tyrosine hydroxylase distribution in the zebra brain (*Danio rerio*) lead to identification of an ascending dopaminergic system in a teleost. *Brain Res Bull.* 2002; 57: 385-397.
- Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.* 2006; 2: 409-430.
- Rodier PM. Developing brain as a target of toxicity. *Environ Health Perspect.* 1995; 103: 73-76.
- Rosemberg DB, Rico EP, Guidoti MR, Dias RD, Souza DO, Bonan CD, et al. Adenosine deaminase-related genes: molecular identification, tissue expression pattern and truncated alternative splice isoform in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci.* 2007; 81: 1526-1534.
- Rosemberg DB, Rico EP, Senger MR, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD, et al. Kinetic characterization of adenosine deaminase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2008; 151: 96-101.
- Rosemberg DB, Rico EP, Langoni AS, Spinelli JT, Pereira TC, Dias RD, et al. NTPDase family in zebrafish: nucleotide hydrolysis, molecular identification and gene expression profiles in brain, liver and heart. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2010; 155: 230-240.
- Roth JA, Garrick MD. Iron interactions and other biological reactions mediating the physiological and toxic actions of manganese. *Biochem Pharmacol.* 2003; 66: 1-13.
- Roth JA. Are there common biochemical and molecular mechanisms controlling manganese and parkinsonism. *Neuromolecular Med.* 2009; 11: 281-296.
- Roth J, Ponzoni S, Aschner M. Manganese homeostasis and transport. *Met Ions Life Sci.* 2013; 12: 169-201.
- Sahoo SK, Jyot G, Battu RS, Singh B. Dissipation kinetics of trifloxystrobin and tebuconazole on chili and soil. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2012; 88: 368-371.

- Saji H, Iida Y, Kawashima H, Ogawa M, Kitamura Y, Mukai T, Shimazu S, Yoneda F. *In vivo* imaging of brain dopaminergic neurotransmission system in small animals with high-resolution single photon emission computed tomography. *Anal Sci.* 2003; 19: 67-71.
- Sanchez-Betancourt J, Anaya-Martínez V, Gutierrez-Valdez AL, Ordoñez-Librado JL, Montiel-Flores E, Espinosa-Villanueva J, Reynoso-Eraza L, Avila-Costa MR. Manganese mixture inhalation is a reliable Parkinson disease model in rats. *Neurotoxicology.* 2012; 33: 1346-1355.
- Schmidel AJ, Assmann KL, Werlang CC, Bertencello KT, Francescon F, Rambo CL, Beltrame GM, Calegari D, Batista CB, Blaser RE, Roman Júnior WA, Conterato GM, Piato AL, Zanatta L, Magro JD, Rosemberg DB. Subchronic atrazine exposure changes defensive behaviour profile and disrupts brain acetylcholinesterase activity of zebrafish. *Neurotoxicol Teratol.* 2014; 44: 62-69.
- Schock EN, Ford WC, Midgley KJ, Fader JG, Giavasis MN, McWhorter ML. The effects of carbaryl on the development of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Zebrafish.* 2012; 9: 169-178.
- Schröder H, Zilles K, Maelicke A, Hajós F. Immunohisto- and cytochemical localization of cortical nicotinic cholinergic receptors in rat and man. *Brain Res.* 1989; 502: 287-295.
- Senger MR, Rico EP, Dias RD, Bobo MR, Bonan CD. Ecto-5'-nucleotidase activity in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2004; 139: 203-207.
- 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.* 2005; 212: 107-115.
- Senger MR, Rosemberg DB, Rico EP, de Bem Arizi M, Dias RD, Bogo MR, et al. In vitro effect of zinc and cadmium on acetylcholinesterase and ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Toxicol In Vitro.* 2006; 20: 954-958.
- Senger MR, Rosemberg DB, Seibt KJ, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Influence of mercury chloride on adenosine deaminase activity and gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Neurotoxicology.* 2010; 31: 291-296.
- Sesack SR, Carr DB, Omelchenko N, Pinto A. Anatomical substrates for glutamate-dopamine interactions: evidence for specificity of connections and extrasynaptic actions. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 1003: 36-52.
- Seth PK, Chandra SV. Neurotransmitters and neurotransmitter receptors in developing and adult rats during manganese poisoning. *Neurotoxicology.* 1984; 5: 67-76.

- Settivari R, Levora J, Nass R. The divalent metal transporter homologues SMF-1/2 mediate dopamine neuron sensitivity in caenorhabditis elegans models of manganese and parkinson disease. *J Biol Chem*. 2009; 284: 35758-35768.
- Shafferman A, Kronman C, Flashner Y, Leitner M, Grosfeld H, Ordentlich A. Mutagenesis of human acetylcholinesterase Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. *J Biol Chem*. 1992; 267: 640-648.
- Shaked I, Zimmermann G, Soreq H. Stress-induced alternative splicing modulations in brain and periphery: acetylcholinesterase as a case study. *Ann N Y Acad Sci*. 2008; 1148: 269-281.
- Shen HY, Chen JF. Adenosine A(2A) receptors in psychopharmacology: modulators of behavior, mood and cognition. *Curr Neuropharmacol*. 2009; 7: 195-206.
- Shen HY, Singer P, Lytle N, Wei CJ, Lan JQ, Williams-Karnesky RL, Chen JF, Yee BK, Boison D. Adenosine augmentation ameliorates psychotic and cognitive endophenotypes of schizophrenia. *J Clin Invest*. 2012; 122: 2567-2577.
- Shin JT, Fishman MC. From zebrafish to human: modular medical models. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2002; 3: 311-40.
- Shukla GS, Singhal RL. The present status of biological effects of toxic metals in the environment: lead, cadmium, and manganese. *Can J Physiol Pharmacol*. 1984; 62: 1015-1031.
- Sibley DR, Monsma FJ. Molecular biology of dopamine receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 1992; 13: 61-69.
- Siebel AM, Menezes FP, Capiotti KM, Kist LW, da Costa Schaefer I, Frantz JZ, Bogo MR, Da Silva RS, Bonan CD. Role of adenosine signaling on pentylentetrazole-induced seizures in zebrafish. *Zebrafish*. 2015; 12: 127-136.
- SINDAG. Dados de Mercado. 2012, Brasília: Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. Disponível em: <http://www.sindag.com.br/dados_mercado.php>
- Singer ML, Oreschak K, Rhinehart Z, Robison BD. Anxiolytic effects of fluoxetine and nicotine exposure on exploratory behavior in zebrafish. *PeerJ*. 2016; 4: e2352.
- Sokoloff P, Schwartz JC. Novel dopamine receptors half a decade later. *Trends Pharmacol Sci*. 1995; 16: 270-275.
- Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci*. 2001; 2: 294-302.

- Stehle JH, Rivkees SA, Lee JJ, Weaver DR, Deeds JD, Reppert SM. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. *Mol Endocrinol*. 1992; 6: 384-393.
- Sternweis PC, Smrcka AV. G proteins in signal transduction: the regulation of phospholipase C. *Ciba Found Symp*. 1993; 176: 96-111.
- Sun L, Xu W, Peng T, Chen H, Ren L, Tan H, Xiao D, Qian H, Fu Z. Developmental exposure of zebrafish larvae to organophosphate flame retardants causes neurotoxicity. *Neurotoxicol Teratol*. 2016; 55: 16-22.
- Taylor P, Radic Z. The cholinesterases: from genes to protein. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1994; 34: 281-320.
- Tilton FA, Bammler TK, Gallagher EP. Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2011; 153: 9-16.
- Tomás-Camardiel M, Herrera AJ, Venero JL, Cruz Sánchez-Hidalgo M, Cano J, Machado A. Differential regulation of glutamic acid decarboxylase mRNA and tyrosine hydroxylase mRNA expression in the aged manganese-treated rats. *Brain Res Mol Brain Res*. 2002; 103: 116-129.
- Toni C, Ferreira D, Kreutz LC, Loro VL, Barcellos LJ. Assessment of oxidative stress and metabolic changes in common carp (*Cyprinus carpio*) acutely exposed to different concentrations of the fungicide tebuconazole. *Chemosphere*. 2011; 83: 579-584.
- Ungerstedt U. 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine pathway: the turning syndrome. *Pharmacol Ther B*. 1976; 2: 37-40.
- Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev*. 2000; 24: 125-132.
- van der Zee EA, Matsuyama T, Strosberg AD, Traber J, Luiten PG. Demonstration of muscarinic acetylcholine receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain and upper brainstem. *Histochemistry*. 1989; 92: 475-485.
- Venton BJ, Zhang H, Garris PA, Phillips PE, Sulzer D, Wightman RM. Real-time decoding of dopamine concentration changes in the caudate-putamen during tonic and phasic firing. *J Neurochem*. 2003; 87: 1284-1295.
- Verheij MM, Cools AR. Twenty years of dopamine research: individual differences in the response of accumbal dopamine to environmental and pharmacological challenges. *Eur J Pharmacol*. 2008; 585: 228-244.
- von Lubitz DK. Adenosine and cerebral ischemia: therapeutic future or death of a brave concept? *Eur. J. Pharmacol*. 1999; 371: 85-102.

- Wang D, Du X, Zheng W. Alteration of saliva and serum concentrations of manganese, copper, zinc, cadmium and lead among career welders. *Toxicol Lett.* 2008; 176: 40-47.
- Watson FL, Schmidt H, Turman ZK, Hole N, Garcia H, Gregg J, Tilghman J, Fradinger EA. Organophosphate pesticides induce morphological abnormalities and decrease locomotor activity and heart rate in *Danio rerio* and *Xenopus laevis*. *Environ Toxicol Chem.* 2014; 33: 1337-1345.
- Wedler FC, Denman RB. Glutamine synthetase: the major Mn(II) enzyme in mammalian brain. *Curr Top Cell Regul.* 1984; 24: 153-169.
- Wei CJ, Singer P, Coelho J, Boison D, Feldon J, Yee BK, Chen JF. Selective inactivation of adenosine A(2A) receptors in striatal neurons enhances working memory and reversal learning. *Learn Mem.* 2011; 18: 459-474.
- Wess J. Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44: 423-450.
- Xia S, Zhu Y, Xu X, Xia W. Computational techniques in zebrafish image processing and analysis. *J Neurosci Methods.* 2012; S0165-0270: 00465-7.
- Yamamoto K, Ruuskanen JO, Wullimann MF, Vernier P. Two tyrosine hydroxylase genes in vertebrates New dopaminergic territories revealed in the zebrafish brain. *Mol Cell Neurosci.* 2010; 43: 394-402.
- Zavialov AV, Engström A. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. *Biochem J.* 2005; 391: 51-57.
- Zeiss CJ. Neuroanatomical phenotyping in the mouse: the dopaminergic system. *Vet Pathol.* 2005; 42: 753-773.
- Zhang B, Chen X, Pan R, Xu T, Zhao J, Huang W, Liu Y, Yin D. Effects of three different embryonic exposure modes of 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether on the path angle and social activity of zebrafish larvae. *Chemosphere.* 2017; 169: 542-549.
- Zhang D, Kanthasamy A, Anantharam V, Kanthasamy A. Effects of manganese on tyrosine hydroxylase (TH) activity and TH-phosphorylation in a dopaminergic neural cell line. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011; 254: 65-71.
- Zimmermann FF, Altenhofen S, Kist LW, Leite CE, Bogo MR, Cognato GP, Bonan CD. Unpredictable Chronic Stress Alters Adenosine Metabolism in Zebrafish Brain. *Mol Neurobiol.* 2016; 53: 2518-2528.

- Zimmermann FF, Gaspary KV, Leite CE, De Paula Cognato G, Bonan CD. Embryological exposure to valproic acid induces social interaction deficits in zebrafish (*Danio rerio*): A developmental behavior analysis. *Neurotoxicol Teratol.* 2015; 52(Pt A): 36-41.
- Zimmermann FF, Gaspary KV, Siebel AM, Leite CE, Kist LW, Bogo MR, Bonan CD. Analysis of Extracellular Nucleotide Metabolism in Adult Zebrafish After Embryological Exposure to Valproic Acid. *Mol Neurobiol.* 2016.
- Zimmermann G, Soreq H. Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell Tissue Res.* 2006; 326: 655-669.
- Zimmermann H. 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J.* 1992; 285: 345-365.
- Zimmermann H. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 1996a; 49: 589-618.
- Zimmermann H. Extracellular purine metabolism. *Drug Dev Res.* 1996b; 39: 337-352.
- Zimmermann H. Purinergic signaling in neural development. *Semin Cell Dev Biol.* 2011; 22: 194-204.
- Zirger JM, Beattie CE, McKay DB, Boyd RT. Cloning and expression of zebrafish neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Gene Expr Patterns.* 2003; 3: 747-75.

ANEXO



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 121/14 - CEUA

Porto Alegre, 09 de janeiro de 2014.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 13/00354, intitulado **“Envolvimento dos sistemas purinérgico, coinérgico e dopaminérgico na neurotoxicidade induzida por metais e agrotóxicos em zebrafish (Danio rerio)”**.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Atenciosamente,


Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilma. Sra.
Profa. Carla Denise Bonan
FABIO
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512
CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS
Fone: (51) 3353-6365
E-mail: ceua@pucrs.br