

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO DAS SIRTUÍNAS FRENTE A MODELO DE
INFLAMAÇÃO EM ZEBRAFISH E AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS
ASSOCIADOS À INFLAMAÇÃO, APOPTOSE E ESTRESSE OXIDATIVO**

TALITA CARNEIRO BRANDÃO PEREIRA

ORIENTAÇÃO: PROF. DR. MAURÍCIO REIS BOGO
CO-ORIENTAÇÃO: PROFA. DRA. MARIA MARTHA CAMPOS

PORTO ALEGRE
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte – CIP

P436c Pereira, Talita Carneiro Brandão
Caracterização das sirtuínas frente a modelo de inflamação em *zebrafish*
e avaliação de parâmetros associados à inflamação, apoptose e estresse
oxidativo / Talita Carneiro Brandão Pereira. – Porto Alegre, 2016.

55 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Reis Bogo.

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Martha Campos

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande
do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde,
2016.

1. Medicina 2. Biologia molecular 3. Sirtuínas. 4. *Zebrafish*.
5. Estresse oxidativo. I. Título.

CDU 61:576

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E MOLECULAR

TALITA CARNEIRO BRANDÃO PEREIRA

ORIENTAÇÃO: PROF. DR. MAURÍCIO REIS BOGO
CO-ORIENTAÇÃO: PROFA. DRA. MARIA MARTHA CAMPOS

CO-ORIENTADORES INTERNACIONAIS (HARVARD MEDICAL SCHOOL, USA)
PROF. DR. DAVID A. SINCLAIR
PROF. DR. MATTHEW P. HARRIS

**CARACTERIZAÇÃO DAS SIRTUÍNAS FRENTE A MODELO DE
INFLAMAÇÃO EM ZEBRAFISH E AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS
ASSOCIADOS À INFLAMAÇÃO, APOPTOSE E ESTRESSE OXIDATIVO**

Tese apresentada como requisito
para obtenção título de Doutor no
Programa de Pós-Graduação em
Medicina e Ciências da Saúde na
Pontifícia Universidade Católica do
Rio Grande do Sul.

PORTO ALEGRE
2016

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E MOLECULAR

TALITA CARNEIRO BRANDÃO PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DAS SIRTUÍNAS FRENTE A MODELO DE
INFLAMAÇÃO EM ZEBRAFISH E AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS
ASSOCIADOS À INFLAMAÇÃO, APOPTOSE E ESTRESSE OXIDATIVO**

Tese apresentada como requisito
para obtenção título de Doutor no
Programa de Pós-Graduação em
Medicina e Ciências da Saúde na
Pontifícia Universidade Católica do
Rio Grande do Sul.

APROVAÇÃO EM 29 DE FEVEREIRO DE 2016.

BANCA EXAMINADORA:

DR. DENIS BROOCK ROSEMBERG (UFSM)

DR. CRISTIANO VALIM BIZZARO (PPGBCM/PUCRS)

DRA. MONICA RYFF VIANNA (PPGBCM/PUCRS)

DRA. FERNANDA BUENO MORRONE (PPGMCS/PUCRS)

PORTO ALEGRE
2016

CERTEZA

De tudo, ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando.
A certeza de que precisamos continuar.
A certeza de que seremos interrompidos
antes de terminar.

Portanto devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo.
Da queda um passo de dança.
Do medo, uma escada.
Do sonho, uma ponte.
Da procura, um encontro.

- *Fernando Pessoa*

AGRADECIMENTOS

Ao longo de quatro anos de doutoramento acumulamos muito mais do que resultados, artigos, conhecimento e experiências. Durante estes anos acumulamos amigos, parceiros, colaboradores e muitos agradecimentos. À todos vocês que participaram da minha vida nestes últimos quatro anos, deixo um carinhoso e eterno obrigada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) agradeço as bolsas de estudos para o curso de doutorado e doutorado-sanduíche no exterior, que permitiram a realização deste trabalho. Agradeço também à Fundação Lemann pelo auxílio complementar durante o doutorado-sanduíche.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da PUCRS agradeço o apoio logístico e burocrático ao longo deste quatro anos, bem como auxílio financeiro para participar dos principais eventos científicos diretamente vinculados ao corpo desta tese.

Ao meu orientador, Maurício Bogo, que foi determinante na minha escolha do programa de pós-graduação, obrigada pela oportunidade de continuar no laboratório que escolhi ainda na graduação; por criar oportunidades de onde sequer imaginávamos existirem; pelo incentivo e principalmente pela relação de confiança que sempre fez parte do nosso dia-a-dia. Que esta parceira perdure por muitos e muitos anos.

À minha co-orientadora, Maria Martha Campos, agradeço a total abertura para me receber no mundo da inflamação. Obrigada por toda a contribuição em cada uma das etapas destes quatro anos, pela sinceridade, envolvimento e disponibilidade com que sempre me recebeste.

Aos meus orientadores internacionais Matthew Harris e David Sinclair, que foram meus mentores durante o período de doutorado-sanduíche em Boston. Serei eternamente grata pela oportunidade ímpar de fazer parte de seus grupos de pesquisa. *Matt, thank you for taking me as your student on a daily basis, for being there every day stimulating my young scientific mind and for cheering me up during the harder times. David, thank you for the biggest opportunity of my life and for making me feel welcome in your lab.*

Aos amigos e colegas do Zeblab pelo espírito de equipe que nos une para fazer o melhor que podemos. Agradeço com carinho especial ao Fabiano pela disponibilidade eterna, à Laura, Natália, Josiane e Stefani pelas dicas e/ou participação em experimentos comportamentais vinculados ao nosso grupo de pesquisa em diferentes momentos, bem como pelo carinho que todos vocês esbanjam sempre. Ao Carlos Eduardo Leite agradeço todo o apoio no *Intox*, bem como a disponibilidade em dividir materiais, protocolos e experiência.

Ao Laboratório de Biologia Genômica e Molecular e seus ICs, mestrandos, doutorandos, pós-doutorandos e técnicas das diferentes eras, obrigada por fazerem minha

segunda casa um lar de muito calor humano, apesar da fria temperatura ambiente. Queridos genômicos e ex-genômicos sintam-se carinhosamente abraçados, pois não arriscaria nomeá-los um por um. Pelas discussões acadêmicas, as conversas amigas e os conselhos, um eterno obrigada. Às “gurias” agradeço ainda o ombro sempre disponível para os momentos mais difíceis e aos *Encontrinhos* mais alegres! Obrigada Giovanna, Gabriela, Kerstin, Fabíola e Luíza por todo e qualquer auxílio experimental.

Aos laboratórios que me receberam em Boston, agradeço a recepção calorosa e o aprendizado constante. *Harris lab, you made me feel at home in such a positive environment. Thank you for making me part of the family in a very short time and for walking me through science, sports and fun; sometimes, all together. Sinclair Lab, thank you for teaching me so much. It was amazing to be part of this great and diverse group of people inside and outside the lab. Thank you Joana, Katrin and Chunmei for your help, inputs and advices in the lab; I could've not done without you.*

Aos “amigos internacionais”, obrigada pela disponibilidade de busca por informações às vezes indisponíveis: Mirian, Ju Torres, Ana Lúcia, Henrique, Richie, Giovanna e Joana, obrigada pelos artigos e pelo tempo que imprimiram na busca dos mesmos. Ainda neste sentido, agradeço à Lisiane, Paula e Natália por todo o auxílio relacionado com a nossa experiência internacional, durante o doutorado-sanduíche. Conselhos, exemplos e modelos foram essenciais e muitas vezes indisponíveis de outra forma.

Aos avaliadores deste trabalho como banca durante a qualificação e como banca de defesa da tese, agradeço a disponibilidade e as sugestões e considerações sempre construtivas.

Ao Fernando, agradeço o incentivo, a compreensão e paciência, que sempre transformou-se em meios de motivação. Obrigada por se fazer presente mesmo na rotina exigente, no Brasil e especialmente Boston. Muito obrigada por estar ao meu lado (virtual ou fisicamente) em cada passo, pelo amor e apoio incondicional, e de sorriso aberto.

À minha irmã, Melina, que apesar da distância contribuiu em tudo que estive ao seu alcance, e a quem dedico a ida ao doutorado-sanduíche, pelo auxílio no *american life-style* antes, durante e depois desta experiência.

Finalmente, aos meus queridos pais, Cláudia e José, que sempre foram além das expectativas e nos ensinaram através do exemplo. Obrigada por incentivarem o nosso melhor sempre, pelo apoio em todas as decisões, por nos acompanharem nos pequenos e nos grandes passos independente da distância física que nos separa, com muito amor, carinho e cuidado. Esta tese é mais um fruto da educação e confiança que me deram. E a conquista é também de vocês.

RESUMO

Inicialmente identificadas em *Saccharomyces cerevisiae* como reguladores de silenciamento de informação, as sirtuínas (SIRTs) são uma diversa família de histonas desacetilases da classe III (HDACs) que atuam como desacetilases, mono-ADP-ribosil transferases, desuccinilases e demalonilases; todas dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺). Presentes em todos os domínios de vida e também em vírus, as sirtuínas se tornaram promissores alvos terapêuticos devido seu envolvimento em diversos processos biológicos, incluindo apoptose, estresse oxidativo e inflamação. Estes por sua vez são considerados denominadores comuns de diversas patologias e podem ser facilmente estudados utilizando os translúcidos embriões e larvas do *zebrafish* (*Danio rerio*) como organismo modelo. Apesar do crescente uso deste pequeno teleosteo de água doce em diversas áreas de estudo, e das sirtuínas terem um promissor, mas pouco esclarecido, papel em eventos de inflamação, apoptose e estresse oxidativo, pouco se sabe sobre as sirtuínas no *zebrafish* - retardando seu uso como ferramenta de *screening* de drogas potencialmente moduladoras das SIRTs. Sob este cenário, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o papel das sirtuínas em modelo de inflamação induzido por sulfato de cobre em larva de *zebrafish*. Alterações em comportamento exploratório da larva, expressão de genes associados a sirtuínas, bem como em marcadores de inflamação, estresse oxidativo e apoptose foram observados após a exposição ao cobre. Para investigar o papel do mais conhecido e abrangente membro das sirtuínas, desenvolvemos uma linhagem nocaute para SIRT1 utilizando a tecnologia CRISPR/Cas9, a qual apresentou resposta inflamatória exacerbada quando exposta ao cobre. Estudos adicionais neste modelo podem contribuir com descobertas sobre a biologia e modulação das SIRTs ao usufruir do potencial translacional do *zebrafish*.

Palavras-chave: sirtuínas, *zebrafish*, inflamação, apoptose, estresse oxidativo, sulfato de cobre, SIRT1, Crispr/Cas9.

ABSTRACT

First identified in *Saccharomyces cerevisiae*, the sirtuins (SIRT) are a diverse family of histone deacetylases that act as deacetylases, ADP-ribosyl transferases, desuccinylases and demalonilases; using nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) as co-substrate. Their regulatory involvement targeting histones, structural proteins and transcription factors implicate them in a broad range of biological processes and raised promising roles as therapeutic targets in apoptosis, oxidative stress and inflammation, among many others. These processes in turn, can be easily modeled in zebrafish (*Danio rerio*), a model organism with great developmental, genetic and economical advantages. Despite growing interest in this fresh water teleost as model organism and the regulatory and therapeutical potential of sirtuins in inflammation and associated processes, next to nothing is known about sirtuins in zebrafish. In order to contribute to this scenario and accelerate zebrafish potential as screening platform for sirtuins modulators, this work aimed to characterize sirtuins roles in a copper-induced inflammation model in zebrafish larvae. Alterations in locomotor behavior, sirtuin-related genes expression pattern and gene expression of inflammation, oxidative stress and apoptosis markers were observed after copper exposure. In order to further evaluate SIRT1 contribution to this scenario, a SIRT1 knockout line was developed using CRISPR-Cas9 technology, which showed an exacerbated inflammatory response after copper exposures. Additional studies will help to elucidate sirtuin roles in inflammation and associated processes, taking advantage of zebrafish's translational potential.

Palavras-chave: sirtuins, *zebrafish*, inflammation, apoptosis, oxidative stress, copper, copper sulphate, SIRT1, Crispr/Cas9.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1. SIRTUÍNAS.....	2
1.1.1. A DESCOBERTA DAS SIRTUÍNAS.....	2
1.1.2. A FAMÍLIA DAS SIRTUÍNAS.....	3
1.1.3. MECANISMO CATALÍTICO.....	6
1.1.4. SIRTUÍNAS COMO ALVOS TERAPÊUTICOS.....	9
1.1.5. SIRTUÍNAS E INFLAMAÇÃO.....	10
1.1.6. SIRTUÍNAS, ESTRESSE OXIDATIVO E APOPTOSE.....	12
1.2. ZEBRAFISH COMO MODELO EXPERIMENTAL.....	14
1.2.1. TECNOLOGIA CRISPR/CAS9 NO ZEBRAFISH.....	16
1.2.2. ZEBRAFISH E SIRTUÍNAS.....	20
2. OBJETIVOS	22

CAPÍTULO II - Artigo de Revisão

<i>“Copper toxicology, oxidative stress and inflammation using zebrafish as experimental model”</i>	23
---	----

1. INTRODUCTION	
2. COPPER METABOLISM AND (DYS)REGULATION	
3. COPPER AND INFLAMMATION: ROLES THROUGH OXIDATIVE STRESS	
4. ZEBRAFISH AS MODEL ORGANISM	
4.1. COPPER METABOLISM IN ZEBRAFISH	
4.2. COPPER-INDUCED INFLAMMATION IN ZEBRAFISH	
5. CONCLUSIONS	
REFERENCES	

CAPÍTULO III - Artigo Original

<i>“SIRT1 is required to subdue acute inflammatory responses in zebrafish”</i>	25
--	----

1. INTRODUCTION	
2. MATERIAL & METHODS	
3. RESULTS & DISCUSSION	
4. CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	
REFERENCES	

CAPÍTULO IV - Considerações Finais.....	31
--	-----------

REFERÊNCIAS.....	34
-------------------------	-----------

ANEXOS.....	41
--------------------	-----------

ANEXO I: APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA NO CEUA/PUCRS

ANEXO II: REQUISITOS OBRIGATÓRIOS E ATIVIDADES ADICIONAIS (2012-2016)

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

1.1. SIRTUÍNAS

1.1.1. A DESCOBERTA DAS SIRTUÍNAS

1.1.2. A FAMÍLIA DAS SIRTUÍNAS

1.1.3. MECANISMO CATALÍTICO

1.1.4. SIRTUÍNAS COMO ALVOS TERAPÊUTICOS

1.1.5. SIRTUÍNAS E INFLAMAÇÃO

1.1.6. SIRTUÍNAS, ESTRESSE OXIDATIVO E APOPTOSE

1.2. ZEBRAFISH COMO MODELO EXPERIMENTAL

1.2.1. TECNOLOGIA CRISPR/CAS9 NO ZEBRAFISH

1.2.2. ZEBRAFISH E SIRTUÍNAS

2. OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

1.1. SIRTUÍNAS

1.1.1. A DESCOBERTA DAS SIRTUÍNAS

Em 1979, Klar e colaboradores publicaram a descoberta do gene MAR1 (*mating-type regulator 1*) na levedura *Saccharomyces cerevisiae* que influenciava o controle de silenciamento transcricional. Alguns anos depois, Jasper Rine descreveu outros quatro genes também relacionados a esse controle, e os nomeou como reguladores de silenciamento de informação (SIR1, 2, 3 e 4), substituindo a nomenclatura dada por Klar (Rine, 1987). Nos anos seguintes, descobriu-se que a proteína SIR2 estava envolvida na recombinação de genes de RNA ribossomal, e também nos mecanismos usados para silenciamento dos genes próximos aos telômeros. Em 1995, genes homólogos a SIR2 foram identificados com envolvimento no processo de silenciamento transcricional, na progressão do ciclo celular e na manutenção da integridade do genoma, apesar de não serem genes essenciais (Brachmann *et al.*, 1995). A partir da descoberta de parálogos de *SIR2* em *S. cerevisiae*, pouco tempo se passou até a identificação de homólogos em outros organismos, mais precisamente, a existência de genes ortólogos em todos os domínios de vida – bactérias, arquea e eucariotos – além dos vírus (Sauve *et al.*, 2006) e assim caracterizando *SIR2* como membro de uma grande e antiga família de proteínas, chamada nos eucariotos de sirtuínas; do inglês, *Silent Information Regulator Two proteins* (Michan *et al.*, 2007).

Aparentemente, as funções inicialmente descritas para SIR2 da levedura se dividem entre os vários membros das sirtuínas nos mamíferos, as quais desempenham também novas funções adquiridas e envolvidas em uma variedade de processos fisiológicos (Inoue *et al.*, 2007), como por exemplo, inflamação e diferenciação celular, presentes apenas no espectro das SIRTs e não da Sir2 de *S. cerevisiae* (Horio *et al.*, 2011). Por outro lado, os genes relacionados às sirtuínas foram seletiva e extensamente perdidos ao longo da evolução em diferentes grupos de organismos (principalmente nos insetos, nematódeos e plantas); entretanto, a perda pontual de algumas isoformas parece ser compensada por funções redundantes exercidas pelos demais membros da família (Greiss *et al.*, 2009).

Em 1999, Frye relatou a descoberta das primeiras cinco sirtuínas humanas (SIRT1-5), e no ano seguinte identificou outras duas (SIRT6 e 7) (Frye, 1999; 2000). Durante suas pesquisas, identificou também que as sirtuínas de bactérias, leveduras e mamíferos seriam capazes de transferir grupos ADP-ribose do nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) (Frye, 1999), o que foi confirmado *in vitro* mais tarde como uma função de ADP-ribosil-transferase (Blander *et al.*, 2004). Em 2000, Imai e colaboradores (2000) observaram que as histonas H3 e H4 poderiam aceitar a ADP-ribose do NAD⁺ se estivessem acetiladas. Experimentos posteriores identificaram que o principal mecanismo catalítico das proteínas SIR2 era na verdade a desacetilação de histonas e não a transferência de ADP-ribosil (Blander *et al.*, 2004). A ação catalítica das SIR2 foi então co-caracterizada como desacetilase dependente de NAD⁺ por dois trabalhos independentes (Laudry *et al.*; Smith *et al.*, 2000; Blander *et al.*, 2004).

1.1.2. A FAMÍLIA DAS SIRTUÍNAS

As sirtuínas fazem parte de um expressivo grupo de enzimas, a família das desacetilases de histonas ou HDACs, cujo papel principal é reverter a acetilação regulatória das proteínas tipo histona, influenciando diretamente na estrutura dos nucleossomos e conseqüentemente na transcrição gênica (Gregoretta *et al.*, 2004). Além das histonas, um crescente número de proteínas tem sido identificado como alvo das HDACs, entre eles estão proteínas estruturais e diversos fatores de transcrição (Gallinari, 2007). São classificadas em 3 grupos: classes I, II e III (Ruijter *et al.*, 2003; Morrison *et al.*; Gallinari *et al.*; Hildmann *et al.*, 2007). A primeira caracteriza-se por proteínas com 350-400 aminoácidos (Hildman *et al.*, 2007), de expressão ubíqua e localizadas quase exclusivamente no núcleo (Morrison *et al.*, 2007), enquanto a classe II é formada por HDACs de cerca de 1000 aminoácidos que se movimentam entre o núcleo e o citoplasma em resposta a estímulos celulares (Hildman *et al.*; Morrison *et al.*, 2007). Por último, a classe III contempla a família das sirtuínas, filogenética e funcionalmente diferentes das outras duas classes devido ao seu mecanismo de ação único dependente de NAD⁺, enquanto as classes I e II são dependentes apenas de zinco (Morrison *et al.*, 2007).

As HDACs da classe III, ou sirtuínas, são uma família de enzimas modificadoras de proteínas bastante conservada (Milne *et al.*, 2008). A partir de um estudo filogenético (Frye, 2000) foram divididas em cinco classes: I, II, III, IV e U. A

última é exclusiva de sirtuínas bacterianas enquanto as classes I e IV são exclusivas de eucariotos. Desde então, organismos dos mais variados filos tiveram seus genomas sequenciados, permitindo estudos evolutivos mais completos. Entre eles, Greiss e Gartner (2009) confirmam a classificação dada por Frye, compilando também inferências estruturais e sugerindo subdivisões intra-classes.

As sirtuínas estão conservadas não apenas entre eucariotos, mas também em bactérias e arquea (Blander *et al.*, 2004). Os dois últimos possuem tipicamente uma ou duas sirtuínas, enquanto eucariotos apresentam múltiplas SIRTs (Sauve *et al.*, 2006). Estas, diferem em função, localização celular e processos associados, conforme apresentado na Tabela 1 (compilada de Yamamoto *et al.*, 2007; Kelly *et al.*, 2010; Horio *et al.*, 2011; Stünkel *et al.*, 2011; Baur *et al.*, 2012; Dang, 2014).

Tabela 1. Principais características das sirtuínas de mamíferos.

Classe	Sirtuína	Localização intracelular	Atividade	Processos biológicos envolvidos
I	SIRT1	Núcleo/Citoplasma*	Desacetilase	Metabolismo/Inflamação/ Neurodegeneração/Apoptose/ Proliferação celular/ Regeneração
	SIRT2	Citoplasma/Núcleo*	Desacetilase	Metabolismo/Ciclo celular/ Neuroinflamação
	SIRT3	Mitocôndria/Núcleo*	Desacetilase	Metabolismo/Estresse oxidativo
II	SIRT4	Mitocôndria	ADP-ribosil transferase	Metabolismo
III	SIRT5	Mitocôndria	Desacetilase?, Demalonilase e Desuccinilase	Metabolismo
	SIRT6	Núcleo (heterocromatina)	Desacetilase e ADP- ribosil transferase	Reparo DNA/Inflamação
IV	SIRT7	Núcleo (nucléolo)	Desacetilase?	Transcrição DNAr

(*) Localização secundária; (?) Função pouco proeminente.

A SIRT1 é, sem dúvida, a representante mais estudada do grupo. Encontra-se predominantemente no núcleo, mas com capacidade de deslocar-se ao citosol, e atua em inúmeros processos do metabolismo como na secreção de insulina, mecanismos de neuroproteção, regulação do sistema imune, câncer, estresse oxidativo e apoptose (Stünkel *et al.*, 2011). Com mais de 40 substratos reconhecidos, SIRT2 está presente prioritariamente no citoplasma, mas também pode deslocar-se ao núcleo. Está envolvida na diferenciação de adipócitos, resposta celular ao estresse e regulação do ciclo celular, sua função de destaque,

onde atua no ponto de checagem mitótico (Mahlnecht *et al.*, 2012). As SIRT3, 4 e 5 estão localizadas nas mitocôndrias e estão associadas ao metabolismo energético e a respostas relacionadas ao estresse oxidativo e sinalização celular (Baur *et al.*, 2012). Dentre estas, a SIRT3 vem se destacando devido sua capacidade desacetilase ser a mais robusta entre as sirtuínas mitocondriais, atuando em um maior número de alvos metabólicos e, conseqüentemente, atraindo muito interesse em sua potencial ação benéfica em complicações associadas ao envelhecimento, homeostase metabólica e proteção ao estresse oxidativo (Houtkooper *et al.*, 2012). SIRT4 é a única sirtuína sem substrato para desacetilação conhecido, porém, possui ação de ADP-ribosil transferase. Sua relevância fisiológica e ação precisa no metabolismo ainda é pouco entendida, entretanto já foi proposto que atue como potente supressor tumoral em camundongos e células humanas (Osborne *et al.*, 2014). Recentemente, a SIRT5 é a única com outras duas atividades identificadas, desuccinilase e demalonilase, as quais são aparentemente mais relevantes que sua função desacetilase na regulação do metabolismo celular na mitocôndria (Baur *et al.*, 2012). Finalmente, as sirtuínas 6 e 7 encontram-se no núcleo, sendo a última associada ao nucléolo; e estão relacionadas com estabilidade do genoma e proliferação celular (Gan *et al.*, 2008). A SIRT6 tem um papel importante na manutenção da estrutura da cromatina e reparo do DNA (Imai *et al.*, 2010b), promovendo resistência à danos no DNA e estresse oxidativo através de desacetilação, enquanto sua ação ADP-ribosil transferase, pouco robusta, foi associada com possível autorregulação (Beauharnois *et al.*, 2013). SIRT7 é a menos estudada das sirtuínas, com possível controle na proliferação celular e apoptose (Inoue *et al.*, 2007). Apesar de sua atividade enzimática continuar controversa (Sánchez-Fidalgo *et al.*, 2012; Baur *et al.*, 2012) devido ausência de alvos relevantes conhecidos (Kim & Kim, 2013), existem evidências de envolvimento na regulação da RNA Polimerase (Pol I) (Beauharnois *et al.*, 2013).

Quanto às características estruturais, a família das sirtuínas possui um domínio catalítico conservado formado por aproximadamente 275 aminoácidos (Sauve *et al.*, 2006; Milne *et al.*, 2008), flanqueado por sequências de tamanho variado em sua porção N- e C-terminal (Michan *et al.*, 2007; Milne *et al.*, 2008). Nos últimos anos, evidências apontam a participação destas regiões na especificidade de ação e potencialmente em funções de autoregulação; contudo, sua possível base molecular ainda é desconhecida (Yuan & Marmorstein, 2012). Foram

determinadas mais de 40 estruturas cristalográficas de sirtuínas de bactérias, arquea, levedura e humana (Sauve *et al.*, 2006; Yuan & Marmorstein, 2012) que apresentam alto grau de superposição estrutural (Sanders *et al.*, 2010). Sua estrutura básica está representada na Figura 1, e consiste de dois domínios: o maior, com dobramento do tipo *Rossmann* e característico de proteínas que interagem com NAD⁺/NADH e o menor e estruturalmente mais diverso, composto pelo módulo de ligação com zinco e pelo módulo de hélice (Denu, 2005; Holbert *et al.*, 2005; Sauve *et al.*, 2006; Sanders *et al.*, 2007; 2010). Tais domínios são conectados por uma série de voltas (ou *loops*) que formam uma pronunciada e extensa fenda central (Sanders *et al.*, 2010), zona em que ocorre a ligação com o NAD⁺ e com o substrato, e cujas posições variam entre as diferentes sirtuínas (Sauve *et al.*, 2006).

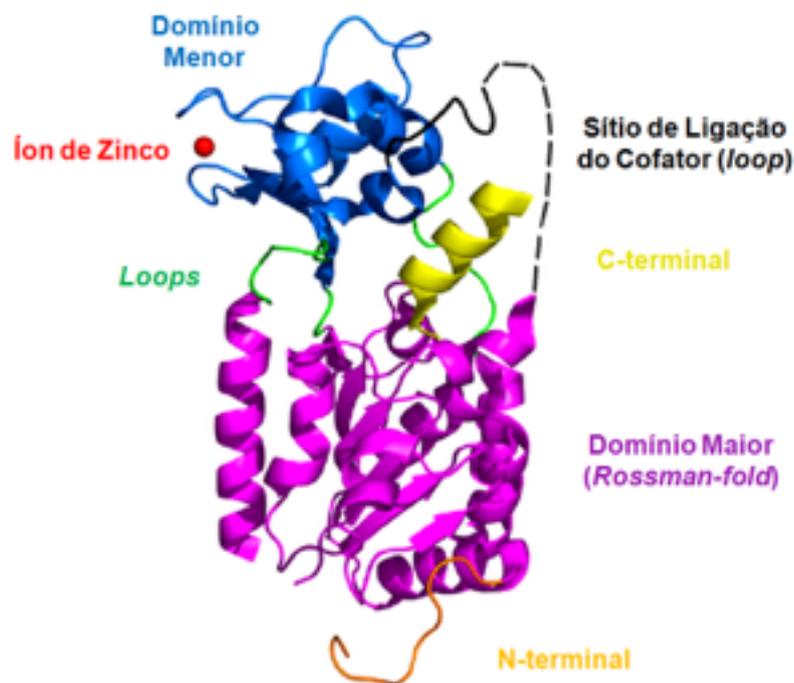


Figura 1. Estrutura básica das sirtuínas. (Fonte: adaptado de SANDERS *et al.*, 2010).

1.1.3. MECANISMO CATALÍTICO

Um importante indicativo do mecanismo molecular da atividade das sirtuínas veio da relação estequiométrica entre desacetilação e a hidrólise do NAD⁺. Para cada acetil-lisina que é desacetilada, uma molécula de NAD⁺ é clivada, formando dois produtos: nicotinamida (Nam) e O-acetil-ADP-ribose (O-AADPR) (Figura 2A)

(Blander *et al.*, 2004; Sauve *et al.*, 2006). Duas características desta reação são interessantes: a formação de um composto como produto da reação nunca antes identificado, o O-AADPR (O-acetil-ADPR), e a presença do NAD⁺ como co-substrato.

Quanto à formação do O-AADPR, continuamos entendendo muito pouco de sua função celular (Sauve, 2010). Evidências sugerem que este exerça efeito biológico de molécula sinalizadora (Sauve *et al.*, 2006) como segundo mensageiro de uma via de sinalização ainda desconhecida (Sánchez-Fidalgo *et al.*, 2012), e cuja degradação, é responsabilidade da família das hidrolases nudix (Sauve *et al.*, 2006). Por outro lado, estudos estruturais mostraram que O-AADPR pode formar complexos com a sirtuína que o produziu, sugerindo um possível papel inibitório (Chang *et al.*, 2002; Sauve *et al.*, 2006). Trabalhos sugerem que OAADPR parece atuar em silenciamento gênico, canais iônicos e regulação redox e talvez possa atuar em sinergia com as sirtuínas em casos específicos de desacetilação (Tong & Denu, 2010).

A presença do NAD⁺ é cinética e termodinamicamente desnecessário para desacetilar uma proteína, e um exemplo disso é a ação das HDACs de classe I e II. Uma possível justificativa é a formação de um novo composto (O-AADPR), aparentemente importante biologicamente como segundo mensageiro e regulador de desacetilação protéica (Sauve *et al.*, 2006) via regulação das sirtuínas (Blander *et al.*, 2004). Isso permitiria ainda uma ligação entre regulação transcricional por desacetilação e metabolismo energético celular (Sauve *et al.*, 2006; Gallinari *et al.*, 2007). Ainda neste sentido, NAM, outro produto da reação, atua como inibidor não competitivo e uma fonte de regeneração de NAD⁺.

A atividade desacetilase não foi inicialmente identificada em duas sirtuínas de mamíferos: SIRT4 e SIRT6 (Michan *et al.*; Yamamoto *et al.*, 2007). Estas possuem a atividade de ADP-ribosil transferase mais pronunciada e também dependente de NAD⁺ (Figura 2B) (Haigis *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2007). Ao contrário da desacetilação, a ação de ADP-ribosil-transferase dependente de NAD⁺ não é exclusiva das sirtuínas. Existem três grupos de enzimas com essa função, classificadas de acordo com seus alvos: as ADP-ribosil transferases modificadoras de proteínas, as modificadoras de ácidos nucleicos e as modificadoras de pequenas moléculas; sendo as sirtuínas parte do primeiro grupo (Lin, 2007).

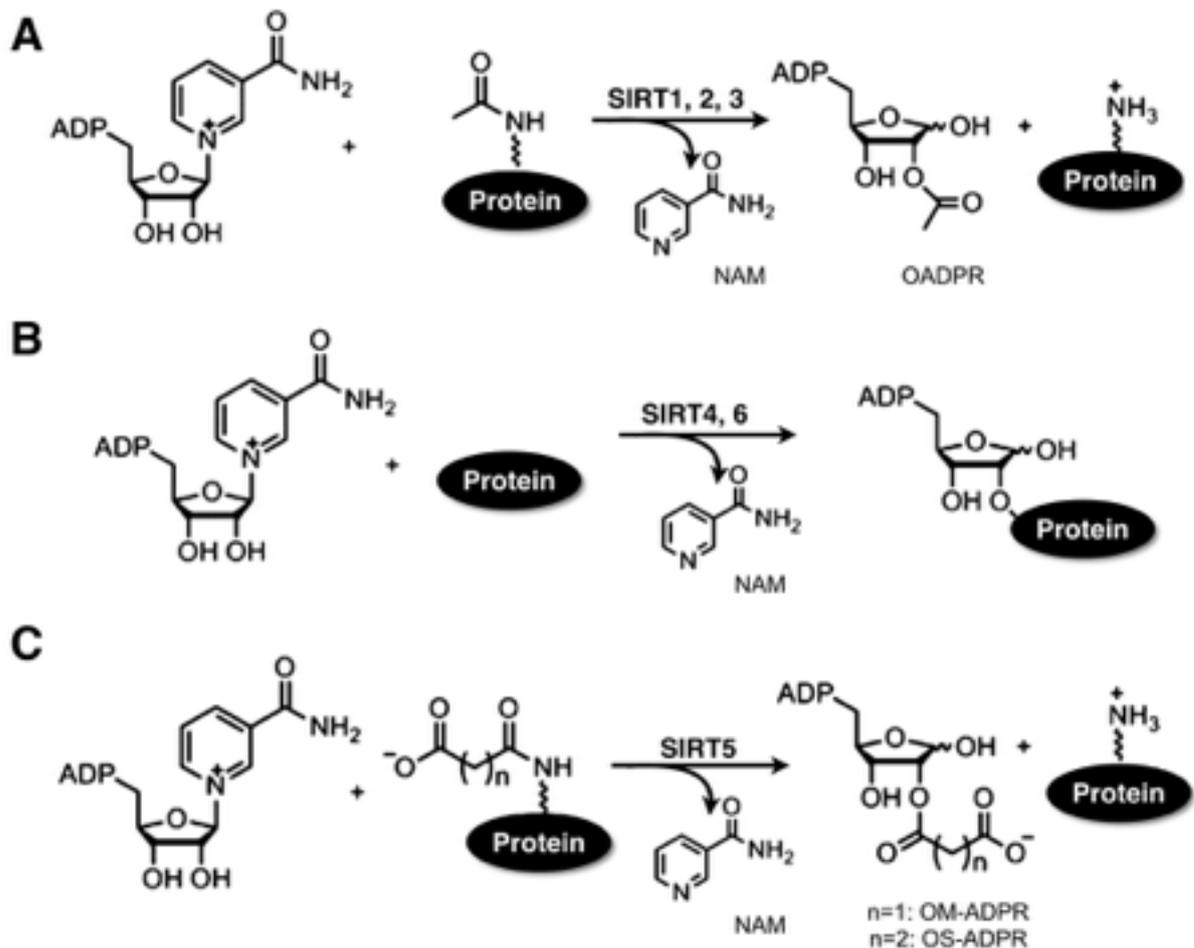


Figura 2. Estrutura química e enzimologia básica da ação catalítica das sirtuínas como (A) desacetilase (B) ADP-ribosil-transferase (C) desuccinilase e demalonilase. NAM: nicotinamida; NAD⁺: nicotinamide dinucleotide; OM-ADPR: O-malonil-ADP-ribose; OS-ADPR: O-succinil-ADP-ribose. (Fonte: adaptado de Li *et al.*, 2015).

As atividades de desuccinilase e demalonilase também fazem parte da ação das sirtuínas, exclusivamente via SIRT5. Ambas atividades são consideradas modificações reversíveis e dinâmicas de acil-lisina, usadas como mecanismo altamente conservado de regulação pós-traducional. Por tanto, desacilases, seria o termo mais apropriado caracterizar a família das sirtuínas (Hirschey & Zhao, 2015), apesar de ambas nomenclaturas continuarem em uso.

O crescente interesse sobre as sirtuínas atraiu também um olhar renovado ao NAD⁺. Se originalmente era visto apenas como importante co-fator de enzimas em reações redox, hoje sabe-se que o NAD⁺ pode atuar como cosubstrato e coenzima, fornecendo uma via de transferência energética entre diferentes processos metabólicos (Verdin, 2015). O significado biológico das vias biosintéticas do NAD⁺ na regulação da atividade enzimática das sirtuínas tem sido destaque devido à

possibilidade de utilizá-lo como agente modulador da atividade das SIRT6s. Estas enzimas não requerem a presença de NADH, NADP ou NADPH, apenas de NAD⁺ (Imai *et al.*, 2010). Essa conexão entre a concentração intracelular deste último e a atividade das sirtuínas faz das mesmas verdadeiros sensores do estado metabólico representado pelo NAD⁺ (Imai *et al.*, 2010; Gallí *et al.*, 2011). Os níveis de NAD⁺ são mantidos por diferentes vias, mas principalmente a partir da via de salvamento, reciclando nicotinamida (NAM) em NAD⁺ e aliviando o efeito inibitório da primeira nas SIRT6s (Verdin, 2015); e portanto vem sendo sugerido como “oscilador metabólico” capaz de conectar ritmo fisiológico, metabolismo e envelhecimento, abrangendo novos aspectos para o estudo das complicações metabólicas oriundas do desbalanço deste sistema (Imai *et al.*, 2010). Revisões recentes compilam relatos de que as atividades das SIRT6s e os níveis de NAD⁺ decrescem durante o envelhecimento, e mais especificamente que o primeiro ocorra devido à diminuição do segundo, já que suplementação de precursores de NAD⁺ resgata atividade das mesmas (Imai & Guarante, 2014).

1.1.4. SIRTUÍNAS COMO ALVOS TERAPÊUTICOS

Quando a SIR2 foi descoberta, há mais de 30 anos atrás, dificilmente poderia se ter antecipado quanto interesse essa família de proteínas tem gerado (Michan *et al.*, 2007). Hoje se reconhece que estas estão envolvidas em diversas funções celulares muito além do silenciamento transcricional (Porcu *et al.*, 2005). As sirtuínas constituem uma família de sensores metabólicos que traduzem alterações dos níveis de NAD⁺ em respostas adaptativas (Houtkooper, 2012), afetando uma ampla série de processos fisiológicos (Haigis *et al.*, 2006) incluindo: repressão da transcrição, regulação da expectativa de vida, regulação da atividade metabólica e enzimática, resposta celular ao estresse, neurodegeneração, reparo de DNA, recombinação de DNAr, apoptose e controle de proliferação celular (Sauve *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2007). Nos últimos anos, as sirtuínas se destacam como alvos importantes de pesquisas relacionadas à restrição calórica, câncer, doenças neurodegenerativas, diferenciação muscular, inflamação e obesidade (Porcu *et al.*, 2005; Haigis *et al.*, 2006; Saunders *et al.*, 2007; Gan *et al.*, 2008).

A partir de evidências experimentais sugerindo que as sirtuínas participam de diversos processos celulares como os citados previamente, a possibilidade de modulá-las farmacologicamente seria uma opção para uso terapêutico (Porcu *et al.*,

2005). Até poucos anos atrás, o maior obstáculo para entender as interações sirtuína-ligante, e conseqüentemente seus potenciais moduladores, era o número limitado de estruturas resolvidas com as diferentes isoformas e diferentes ligantes; devido à complexidade de interações com seus dois substratos (Moniot *et al.*, 2012). Nos últimos anos foram resolvidas as estruturas de SIRT1 de diferentes espécies, além de estruturas de SIRT2, 3, 5 e 6 de humanos (revisado por Yuan & Marmorstein, 2012); as quais potencializam a identificação de reguladores (inibidores ou ativadores) que auxiliem no esclarecimento da ação das sirtuínas em diferentes doenças, bem como no desenvolvimento do papel terapêutico destas enzimas (Sauve *et al.*, 2006; Moniot *et al.*, 2012).

As doenças metabólicas e doenças relacionadas ao envelhecimento vem se destacando nesse cenário. Diferentes autores sugerem que a modulação das sirtuínas seja, no futuro, um possível caminho para aliviar os efeitos e complicações do envelhecimento (Michan; Westphal *et al.*; Yamamoto *et al.*, 2007; Gan *et al.*; Milne *et al.*; Outeiro *et al.*, 2008) como a diabetes, o câncer, as doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Michan *et al.*, 2007), todas conectadas, em algum grau, com condições patológicas de inflamação; a qual vem sendo considerada como processo mediador chave de doenças crônicas e associadas ao envelhecimento (McGuinness, *et al.*, 2011). Neste sentido, diversos trabalhos vem avaliando o potencial de suplementação de moléculas precursoras de NAD⁺ como terapia global contra os efeitos deletérios do envelhecimento (Imai & Guarente, 2014; Verdin, 2015).

1.1.5. SIRTUÍNAS E INFLAMAÇÃO

A inflamação representa uma resposta multifatorial mediada pela interação entre células do sistema imune e mediadores da inflamação. Diversos estímulos podem estar relacionados com o estabelecimento da resposta inflamatória, tais como lesão tecidual ou infecção. Os mediadores químicos podem ser pré-formados, sendo armazenados em estruturas celulares especializadas ou ainda, sua produção pode estar relacionada com mecanismos de síntese *de novo*, dependente da ativação de fatores de transcrição específicos (Sánchez-Fidalgo *et al.*, 2012). Dentre estes, o fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) se destaca quando nos referimos ao papel das sirtuínas na inflamação. A família NF- κ B de fatores de transcrição é formada por cinco membros, com um reconhecido papel na

inflamação e regulando uma ampla lista de genes pró-inflamatórios (Tilstra *et al.*, 2011). Ademais, evidências moleculares já mostraram que o sistema NF- κ B está constantemente ativado durante o envelhecimento, fornecendo mais uma conexão entre este e a inflamação (Sánchez-Fidalgo *et al.*, 2012) e, controlando também, a atividade de genes envolvidos na apoptose, senescência e imunidade (Kawahara *et al.*, 2009).

Neste mesmo cenário aparecem as sirtuínas, associadas recentemente ao controle da expressão de diversos mediadores inflamatórios (Gallí *et al.*, 2011). Entre eles, as SIRTs são capazes de regular a ação do NF- κ B, cuja interação reflete a ligação entre inflamação, metabolismo e envelhecimento (Natoli, 2009). Assim, apesar dos mecanismos moleculares não serem inteiramente entendidos, SIRT1 e SIRT6 estão associadas à inflamação e ao NF- κ B. SIRT1 desacetila diretamente uma das subunidades do NF- κ B, enquanto SIRT6 interage na região do promotor do mesmo, atuando também a nível transcricional, em ambos os casos reduzindo a ação do NF- κ B e sua ação pró-inflamatória (Tilstra *et al.*, 2011; Sánchez-Fidalgo *et al.*, 2012). Pais *et al.* (2013) relataram a contribuição protetora de SIRT2 na neuroinflamação mediada pela microglia. NF- κ B hiperacetilado na ausência de SIRT2 e aumento de citrinas pró-inflamatórias foram algumas das variações encontradas em camundongo nocaute para SIRT2. Vakhrusheva e colaboradores (2008) reportaram que camundongos nocaute para SIRT7 desenvolvem cardiomiopatia inflamatória, sugerindo que a ação supressora da inflamação possa ser comum a mais uma sirtuína, embora o possível mecanismo responsável por esta característica não seja conhecido (Tilstra *et al.*, 2011). Apesar das evidências discutidas acima, não existe ligação concreta de causa-efeito entre sirtuínas e doenças inflamatórias; porém, para alguns autores, isso seria uma questão de tempo e de estudo (McGuinness *et al.*, 2011). Vale ressaltar que ativadores de sirtuínas e inibidores do NF- κ B tem se mostrado eficazes nas mesmas doenças, incluindo diabetes, aterosclerose, osteoporose, neurodegeneração e doenças inflamatórias (Tilstra *et al.*, 2011).

Contrastando com o papel antiinflamatório majoritariamente atribuído às sirtuínas, alguns trabalhos vêm reportando uma possível ação regulatória positiva de SIRT6, induzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IFN- γ (fator de necrose tumoral α e interferon γ , respectivamente). Devido a esse possível papel dual, acredita-se que as SIRTs sejam capazes de afetar o perfil das citocinas

produzidas por células imunes ativadas de forma muito sutil, atuando em diferentes momentos do processo (Gallí *et al.*, 2011). Preyat e Leo (2013) sugerem que tal papel dual possa ainda ser consequência de alteração na preferência do substrato seguido consecutivamente por alterações de expressão e/ou localização celular, inicialmente induzindo a resposta inflamatória para defender-se rapidamente e em seguida promovendo sua resolução. Consequentemente, é provável que as propriedades pró- e anti-inflamatórias das sirtuínas, dependam do alvo e do modulador que atue sobre as mesmas, bem como do estado metabólico em que se encontra o organismo, sendo necessário um melhor entendimento dessas interações a fim de determinar alvos terapêuticos de relevância.

1.1.6. SIRTUÍNAS, ESTRESSE OXIDATIVO E APOPTOSE

A inflamação crônica tem uma relação direta com o estresse oxidativo (Canizzo *et al.*, 2011), e ambos estão associados ao envelhecimento e às complicações oriundas deste processo (Gallí *et al.*, 2011; Sánchez-Fidalgo *et al.*, 2012). O estresse oxidativo resulta da excessiva produção de diversos radicais livres, coletivamente chamados de espécies reativas ao oxigênio ou ROS (do inglês, *reactive oxygen species*) (Chong *et al.*, 2012), e que são produzidos em diferentes compartimentos celulares, mas principalmente nas mitocôndrias (>90%) (Zhang *et al.*, 2011), durante a respiração celular (Verdin *et al.*, 2010). Seus efeitos tóxicos aparecem em concentrações elevadas (Fang *et al.*, 2012), danificando macromoléculas dentro e fora das mitocôndrias (Giralt *et al.*, 2012). Esse acúmulo de ROS, seguido do declínio na função mitocondrial, contribui para o envelhecimento e aumento da incidência de patologias nessa etapa da vida (D'Aquila *et al.*, 2012).

As sirtuínas têm um papel crítico neste processo. Acredita-se que a SIRT3, a principal sirtuína mitocondrial, esteja envolvida na proteção dos danos mediados por ROS, aumentando a resposta antioxidante de defesa (Morris *et al.*, 2011) e talvez regulando diretamente a produção de ROS, já que a SIRT3 interage com componentes da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (complexos I e III) (Giralt *et al.*, 2012). Assim como a SIRT3, SIRT1 também parece estar envolvida com estresse oxidativo. Ambas parecem aumentar a ação de enzimas das vias detoxificantes de ROS e de fatores de transcrição como PGC1- α e FOXOs (do inglês, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha e*

forkhead box O, respectivamente) (Horio *et al.*; Morris *et al.*, 2011); contudo, mecanismos adicionais ainda precisam ser esclarecidos. SIRT2 também já teve sua ação associada à resistência ao estresse oxidativo, através de deacetilação de FOXOs (D'Aquila *et al.*, 2012), bem como inibição da produção de ROS e supressão de morte celular e neurotoxicidade (Pais *et al.*, 2013).

Outra característica do estresse oxidativo durante o envelhecimento é a redução do óxido nítrico (NO), promovendo inflamação vascular (Shinmura *et al.*, 2011). A SIRT1 consegue regular a produção de NO ao desacetilar (e estimular) a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Ota *et al.*, 2010). Esta última aumenta a produção e biodisponibilidade de NO (Zeng *et al.*, 2009), conferindo efeitos vaso e cardioprotetores que incluem a inibição de sinais pró-inflamatórios e apoptose (Shinmura *et al.*, 2011).

Durante o estresse oxidativo, as sirtuínas interagem com fatores de transcrição importantes, e desempenham um papel determinante no destino da célula: sobrevivência ou morte celular (Rajendram *et al.*, 2011). As sirtuínas promovem a sobrevivência celular através da inibição da produção de ROS, mas principalmente através da desacetilação de algumas proteínas como o supressor tumoral p53 – principal regulador do ciclo celular (Horio *et al.*, 2011) e alvo conhecido das SIRT1, 3 e 7. SIRT1 reduz a habilidade da p53 induzir a expressão gênica dos seus alvos pró-apoptóticos, e conseqüentemente, suprime a apoptose em resposta ao estresse oxidativo. Entretanto, em resposta à sinalização de TNF, inibe a atividade transcricional do NF- κ B, fator de transcrição anti-apoptótico (Rajendram *et al.*, 2011). A ativação ou superexpressão de SIRT1 previne morte celular induzida por estresse e por replicação na senescência, momento em que tanto os níveis de RNAm quanto da proteína SIRT1 estão diminuídos (Wang *et al.*, 2011).

O papel da SIRT3 no processo de apoptose parece mais complexo e menos esclarecido. SIRT3 mantém papel anti-apoptótico (resistência ao estresse) e pró-apoptótico (supressor de tumor), dependendo do tipo de célula e estresse ou estímulo. Sua ação é indispensável na manutenção da integridade e funcionamento da mitocôndria para correta regulação do destino da célula e, por conseguinte, promoção da sobrevivência celular (Alhazzazi *et al.*, 2011). Contudo, também há evidências de um papel pró-apoptótico da SIRT3 em alguns tipos de câncer (Rajendram *et al.*, 2011).

SIRT6 também parece ter implicação na regulação da senescência. De fato, sua expressão diminuída leva a senescência celular prematura e disfunção telomérica, provavelmente devido sua associação com regiões da heterocromatina (Wang *et al.*, 2011). SIRT7 por sua vez, parece ser mais uma isoforma essencial para sobrevivência celular, pois diminuição de expressão inibe o crescimento celular e induz apoptose. Tais efeitos envolvem mais uma sirtuína no processo de apoptose e são provavelmente tecido-específico (Rajendram *et al.*, 2011), pois é altamente expressa apenas em tecidos metabolicamente ativos (Morris *et al.*, 2012). SIRT7 também inativa p53, aumentando a taxa apoptótica em células nocaute para esta isoforma (Horio *et al.*, 2011).

1.2. ZEBRAFISH COMO MODELO EXPERIMENTAL

O *Danio rerio*, popularmente conhecido como *zebrafish*, peixe-zebra ou paulistinha, foi descrito em 1822 por Francis Hamilton e faz parte da família de vertebrados com o maior número de espécies, a família Cyprinidae. As 44 espécies do gênero *Danio*, subfamília Raborinae, têm como algumas de suas características o distinto padrão de coloração (alternância de listras horizontais claras e escuras) e o pequeno tamanho, em torno de 3 a 4cm na espécie *D. rerio* (Spence *et al.*, 2008).

Este pequeno teleósteo de água doce é naturalmente originário do nordeste da Índia, Bangladesh e Nepal (Spence *et al.*, 2008) e se limitava a um popular peixe tropical (Crollius *et al.*, 2005), quando George Streisinger o levou das lojas para o laboratório (Guo, 2004) e estabeleceu as primeiras linhagens modelo. Desde então, o *zebrafish* se tornou um modelo experimental amplamente usado nas mais diversas áreas devido à diversas características técnicas e práticas que incluem: a transparência de seus ovos e larvas que permitem acompanhamento de todo seu rápido ciclo de desenvolvimento, alta fecundidade, curto tempo de geração, conservação anatômica e genômica com humanos (70-80% similaridade) que facilitam desenho experimentação e respostas potencialmente conservadas (Dooley *et al.*, 2000; Guo, 2004). Aliadas à manutenção em pequenos espaços e com baixos custos; fácil administração de drogas solúveis em água (Keller *et al.*, 2004) e rápida aclimação (Spence *et al.*, 2008) este conjunto de características tornaram o *zebrafish* modelo de estudo para várias doenças humanas, com promissor papel para estudos de infecção, inflamação e imunologia, entre outros (Brittijn *et al.*, 2009).

Em publicação recente, Fang e colaboradores (2012) abordaram o uso do *zebrafish* como modelo para estudo da conexão entre o processo inflamatório e mecanismos de estresse oxidativo relevantes no desenvolvimento de condições crônicas de inflamação. Além do alto grau de conservação dos genes envolvidos nesses processos e proteínas com funções homólogas de mamíferos, o *zebrafish* apresenta um suscetível sistema de resposta ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, um atraente modelo para estudo de tais mecanismos e potenciais terapias (Fang *et al.*, 2012). Brittijn e colaboradores (2009) destacam a facilidade com que se induz e observa a resposta inflamatória em embriões de *zebrafish*. A transparência destes animais em estágios iniciais aliada à sensibilidade da resposta inflamatória através de manipulação farmacológica, linhagens transgênicas ou ainda, técnicas para desenvolvimento de modelos de ganho ou perda de função, ratificam potencial uso do *zebrafish* também em *screenings* de drogas anti-inflamatórias e resolução da inflamação. Este cenário não é diferente quando se trata de apoptose, cujas vias em *zebrafish* são funcionalmente mais próximas às de mamíferos, os quais por muito tempo auxiliaram no entendimento do processo de morte celular. Este modelo permite não apenas o estudo dos processos apoptóticos durante o desenvolvimento, como também em resposta aos mais variados estímulos do meio devido à reprodução e desenvolvimento externo e em estruturas translúcidas (Eimon *et al.*, 2010). Assim, o *zebrafish* preenche todos os requisitos para estudos celulares e genéticos em larga escala e ao mesmo tempo aplicável às doenças humanas (Pyati *et al.*, 2010), pois diversas pequenas moléculas moduladoras têm apresentado atividade conservada entre *zebrafish* e humanos (Eimon *et al.*, 2010).

Todas essas características fizeram do *zebrafish* um modelo experimental atraente por combinar uma série de características de desenvolvimento, genéticas e econômicas, refletindo no crescente número de publicações utilizando o modelo animal. Enquanto no início dos anos 90 menos de 100 artigos científicos relacionados com *zebrafish* eram publicados anualmente (Hill *et al.*, 2005), em 2016 uma rápida busca na base de dados do PUBMED/NCBI (do inglês, *National Center for Biotechnology Information*) com '*zebrafish*' como palavra-chave, resulta em cerca de 26.000 artigos.

O *zebrafish* não substituirá o uso de modelos mamíferos. Contudo, ocupa um nicho importante entre os animais modelos mais tradicionais e sistemas *in vitro*,

oferecendo em um contexto celular toda a abrangência de um animal vertebrado, em uma escala antes viável apenas em cultura de células ou em modelos invertebrados (Peterson, 2012). Adicionalmente, seu uso como organismo modelo proporciona uma combinação única devido à facilidade de manipulação e habilidade de modelar doenças humanas a um custo mais acessível que outros modelos vertebrados (Meeker *et al.*, 2008; Brittijn *et al.*, 2009). Sob este panorama, o *zebrafish* aparece para auxiliar na resolução de questões de difícil solução em outros organismos modelos, que, em troca, devem confirmar avanços descobertos no peixe, maximizando seu impacto translacional (Renshaw *et al.*, 2012).

1.2.1. TECNOLOGIA CRISPR/CAS9 NO ZEBRAFISH

A inativação, parcial ou total, de um determinado gene (respectivamente, *knockdown* ou *knockout*), é uma estratégia eficaz para identificar as possíveis funções do mesmo através da manifestação de novos fenótipos. A contribuição do *zebrafish* neste cenário é expressiva, porém até recentemente limitada, devido a impossibilidade de se interromper a função de um gene-alvo por recombinação homóloga em células tronco embrionárias; as quais não foram estabelecidas no modelo apesar de classicamente utilizada em roedores (Hisano *et al.*, 2016). Por muito tempo, uma alternativa foi o uso de *morpholinos* (MO), oligonucleotídeos anti-senso que inibem a tradução do gene alvo gerando por no máximo 7dpf, o *knockdown* do gene-alvo. A estratégia permite avaliar efeitos a curto prazo, porém temporárias e limitadas apenas ao início do desenvolvimento; e às vezes associados à efeitos *off-target* e eventos apoptóticos (Varshney *et al.*, 2015). Em discussão recente, diferentes grupos relataram discrepâncias entre fenótipos obtidos via *knockdown* (anti-senso) e via nocaute (mutações no DNA); cerca de até 80% dos MO utilizados não apresentam os mesmos fenótipos que suas mais recentes versões em linhagem nocaute (Kok *et al.*; Rossi *et al.*; Stainier *et al.*, 2015).

Mais recentemente, uma série de novas técnicas vem aprimorando estratégias para edição de genomas, baseadas no uso de nucleases direcionadas a sítios específicos do genoma. Entretanto, dificuldades de desenho, síntese e validação impediram seu uso generalizado, até muito recentemente. A combinação de avanços concomitantes em diversas áreas permitiu o desenvolvimento de uma nova classe de endonucleases guiadas por RNA capazes de reconhecer e modificar uma região alvo, baseando-se em um tipo específico de sistema imune

adaptativo bacteriano. Nomeada como CRISPR/Cas9, (do inglês, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* e *CRISPR-associated proteins*), esta tecnologia vem causando uma revolução devido a possibilidade de modificar o genoma com precisão, eficiência e versatilidade sem precedentes (Doudna & Charpentier, 2014).

O potencial como ferramenta de edição de genomas apareceu após décadas de pesquisa básica sobre o sistema CRISPR bacteriano; o qual funciona como memória imunológica de infecções prévias, com intuito de agilizar a resposta de defesa em caso de nova exposição ao vírus/plasmídeo. O sistema, com presença estimada em cerca de 40% das bactérias de genoma sequenciado, está organizado em arranjo gênico composto por elementos repetitivos intercalando DNA do hospedeiro e do patógeno, flanqueados por um cluster de genes codificando a maquinaria enzimática necessária para função do complexo (Gonzalez & Yeh, 2014). Variações no componentes moleculares envolvidos na formação do complexo classificam o sistema em três tipos, sendo tipo II o mais bem caracterizado e de menor complexidade, com apenas três componentes. Este consiste na incorporação de pequenas sequências de DNA exógeno, entre sequências repetitivas da própria bactéria, que serão mais tarde transcritas em diversos RNAs CRISPR (ou crRNA). Estes contêm uma sequência CRISPR própria do hospedeiro, e uma sequência do DNA invasor; respectivamente, espaçador e proto-espaçador, como representado na Figura 3a. O crRNA hibridiza com outro RNA transcrito, o tracrRNA (do inglês, *transactivating RNA*) e juntos formam um complexo com a endonuclease Cas9 ativando o sistema de reconhecimento e clivagem do DNA exógeno (Figura 3b). Nesta composição, a Cas9 é guiada ao local alvo no DNA do patógeno pela complementariedade à sequência do proto-espaçador e a sua região adjacente específico para Cas9; o motivo adjacente ao proto-espaçador (ou sequência PAM, em inglês); a qual varia entre diferentes bactérias (Hsu *et al.*, 2014; Sander & Joung, 2014).

de clivagem através de reparo mediado por junção de extremidades não-homologas (ou NHEJ, do inglês, *non-homologue end-joining*); ou (2) introduz sequências 'doadoras' inteiras por reparo por direcionamento homólogo (ou HDR, do inglês, *homology-directed repair*) (Figura 4). Desta forma, e devido ao reparo incorreto da quebra do DNA, a primeira opção tem sido usada na geração de animais nocaute e a segunda, na inserção de variantes funcionais específicas, bem como geração de *knock-ins*, ao alterar por exemplo, o promotor associado ao gene de interesse. Diferente das técnicas de edição de genomas anteriores (ZFNs e TALENs, respectivamente *Zinc-Finger Nucleases* e *Transcriptional Activator-Like Effector Nucleases*) CRISPR/Cas9 é a única que se baseia em pareamento direto de nucleotídeos, enquanto as demais dependem de interações proteína-DNA; potencialmente menos específica e mais laboriosa (Hruscha *et al.*, 2013). Portanto, a simplicidade do desenho dos RNAs-guia, o baixo custo de realização e índices de eficiência de mutagênese compatível ou até superior as técnicas precursoras (Gonzalez & Yeh, 2014), CRISPR/Cas9 provou-se muito versátil, tanto *in vitro* e *in vivo*, e já foi reproduzida nos principais organismos modelos (Hsu *et al.*, 2014).

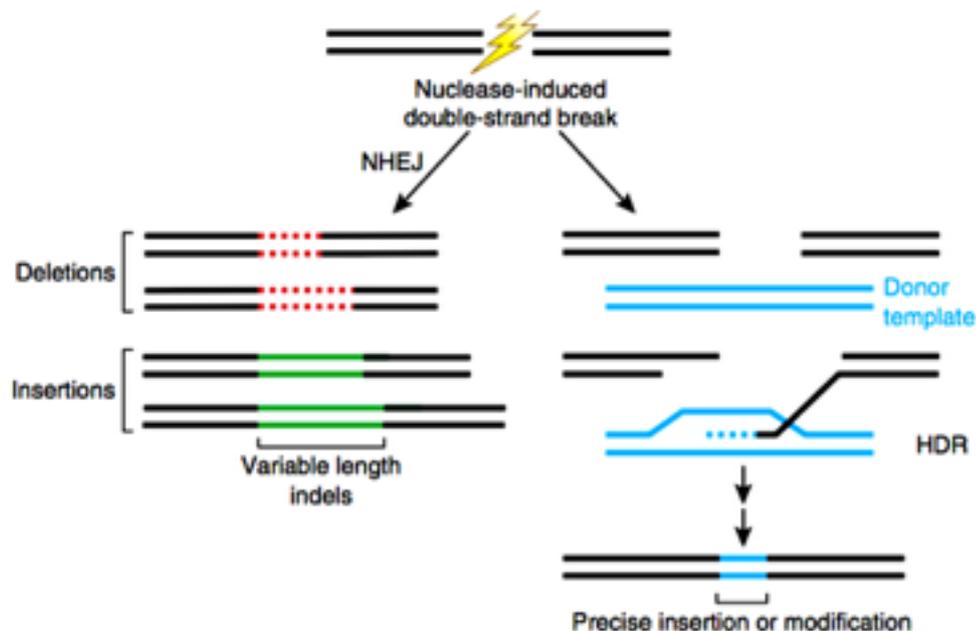


Figura 4. Sistemas de reparo após indução de quebras de DNA-dupla fita. (Fonte: Sanders & Joung, 2014).

No *zebrafish*, dois trabalhos pioneiros foram publicados validando o uso da técnica de CRISPR-Cas9 *in vivo* e com altos níveis de eficiência e especificidade na geração de mutações hereditárias (Hwang *et al.*, 2013; Jao *et al.*, 2013). A principal peculiaridade deste sistema no *zebrafish* é a transcrição *in vitro* do RNA-guia e do RNA da Cas9 seguido de co-injeção dos mesmos em embriões em estágio de 1-célula, devido ao rápido desenvolvimento do animal. Desta forma, maximiza-se a incorporação das potenciais mutações nas células da linhagem germinativa, permitindo o estabelecimento da linhagem mutante após algumas gerações de endo- e retrocruzamentos (Hruscha *et al.*, 2013; Gagnon *et al.*, 2014). O desenvolvimento de linhagem *knock-in* via CRISPR/Cas9 em *zebrafish* foi reportado pouco tempo depois, apesar de obter grau de eficiência bastante reduzido (Irion *et al.*, 2014; Hisano *et al.*, 2015).

1.2.2. SIRTUÍNAS NO ZEBRAFISH

Apesar de estar claro o potencial do *zebrafish* em contribuir de forma importante no avanço do conhecimento e dos desdobramentos envolvendo as sirtuínas, até o momento poucos são os estudos que fazem esta conexão. Isso pode ser atribuído ao fato de ser necessário um investimento na caracterização inicial da família no *zebrafish* para futuramente usufruir das suas qualidades em pesquisas complementares aos modelos tradicionais. Felizmente, iniciativas vem contribuindo para essa caracterização. Depois de identificados os oito genes relacionados às sirtuínas no genoma do *zebrafish* (Potente *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2011) e mapeado o perfil de expressão gênica dos mesmos em diferentes tecidos do *zebrafish* adulto (Pereira *et al.*, 2011), foi possível avaliar o efeito de potenciais agentes moduladores das sirtuínas na sua expressão bem como de parte de seus alvos em tecidos específicos. Por exemplo, o efeito do resveratrol nas SIRT1, 3 e 4, PGC1- α e Nampt (Schirmer *et al.*, 2011) e o efeito da taurina na SIRT1 (Hammes *et al.*, 2012) foram recentemente avaliados no fígado do *zebrafish* adulto. Quanto ao uso de larvas, Potente e colaboradores (2007) observaram o comprometimento do desenvolvimento e remodelação de vasos sanguíneos ao utilizar MOs contra SIRT1, fenótipos correlatos com os avaliados em camundongos.

Em suma, é previsível que ao aliar a versatilidade do *zebrafish* com a abrangência de atuação das sirtuínas se obtenha uma ferramenta para contribuir ao estudo da biologia, modulação, regulação e alvos das SIRTs em uma escala

antes inviável *in vivo*. Portanto, considerando que (1) inflamação está presente em doenças crônicas e em associação ao envelhecimento; (2) sirtuínas aparecem como reguladores metabólicos globais em processos associados à inflamação e (3) o *zebrafish* permite modelar diversos processos fisiológicos e patológicos interconectados à essas condições; este trabalho visa contribuir com o entendimento do papel das sirtuínas na inflamação utilizando *zebrafish* como modelo experimental para futuramente explorar seu potencial translacional.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar o envolvimento das sirtuínas em modelo de inflamação induzido por sulfato de cobre (CuSO_4) em larvas de *zebrafish* (*Danio rerio*).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar revisão sistemática sobre o uso do cobre como agente indutor de inflamação.
- Avaliar o efeito da indução da inflamação por sulfato de cobre em larvas de 7dpf (dias pós-fertilização) sobre:
 - parâmetros de performance locomotora associados à teste exploratório,
 - padrão de expressão gênica de todos os membros da família das sirtuínas,
 - padrão de expressão de genes marcadores de inflamação, apoptose e estresse oxidativo potencialmente relacionados às sirtuínas.
- Implementar a técnica de CRISPR-Cas9 para geração de modelos nocaute para sirtuínas potencialmente envolvidas no processo inflamatório.
- Avaliar o efeito da inflamação induzida por sulfato de cobre em larvas nocaute para sirtuínas envolvidas no processo inflamatório.

CAPÍTULO II - Artigo de Revisão

“Copper toxicology, oxidative stress and inflammation using zebrafish as experimental model”

Talita Carneiro Brandão Pereira
Maria Martha Campos
Maurício Reis Bogo

Minireview | Journal of Applied Toxicology
doi: 10.1002/jat.3303

Copper toxicology, oxidative stress and inflammation using zebrafish as experimental model

Talita Carneiro Brandão Pereira^{a,b,*}, Maria Martha Campos^{a,c,d}
and Maurício Reis Bogo^{a,b,c,e*}

ABSTRACT: Copper is an essential micronutrient and a key catalytic cofactor in a wide range of enzymes. As a trace element, copper levels are tightly regulated and both its deficit and excess are deleterious to the organism. Under inflammatory conditions, serum copper levels are increased and trigger oxidative stress responses that activate inflammatory responses. Interestingly, copper dyshomeostasis, oxidative stress and inflammation are commonly present in several chronic diseases. Copper exposure can be easily modeled in zebrafish; a consolidated model in toxicology with increasing interest in immunity-related research. As a result of developmental, economical and genetic advantages, this freshwater teleost is uniquely suitable for chemical and genetic large-scale screenings, representing a powerful experimental tool for a whole-organism approach, mechanistic studies, disease modeling and beyond. Copper toxicological and more recently pro-inflammatory effects have been investigated in both larval and adult zebrafish with breakthrough findings. Here, we provide an overview of copper metabolism in health and disease and its effects on oxidative stress and inflammation responses in zebrafish models. Copper-induced inflammation is highlighted owing to its potential to easily mimic pro-oxidative and pro-inflammatory features that combined with zebrafish genetic tractability could help further in the understanding of copper metabolism, inflammatory responses and related diseases. Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: copper; oxidative stress; inflammation; zebrafish; Chn assay; copper-induced inflammation

Introduction

Copper (Cu), one of the oldest known metals, has been important to humans since pre-historic ages. It makes up only 0.00007% of Earth's crust (Kim *et al.*, 2008) and is naturally found in rock and dispersed into air, soil and water by geological, meteorological or biological processes (Milanino and Buchner, 2006). Copper world's production has steadily increased since the 1900s mostly for electrical/electronic consumption, construction, transport and industrial applications (Fage *et al.*, 2014). Nonetheless, copper is essential to life itself. Together with other metals such as iron and zinc, copper is a crucial micronutrient, being a catalytic and structural cofactor of various enzymes involved in a broad range of processes including energy metabolism, mitochondrial respiration and antioxidant defenses (Tisato *et al.*, 2010). Its critical role is promoting structural changes, catalytic activities and protein–protein interactions take place through direct interactions with amino acid side-chains and polypeptides chains (Kim *et al.*, 2008; Festa and Thiele, 2011).

Although some compounds exist with Cu³⁺ and Cu⁴⁺ oxidation states, in biological systems, copper ions are mostly under either Cu⁺ (cuprous, reduced) or Cu²⁺ (cupric, oxidized) states (Scheiber *et al.*, 2014). Furthermore, switching between these states generates hydroxyl radicals that are crucial to different cellular enzymes activities involved in energy metabolism, respiration and DNA synthesis (Tisato *et al.*, 2010). Still, free radicals produced in redox reactions can cause oxidative deterioration of biological macromolecules; and so, copper can be highly toxic. For this reason, copper levels are tightly regulated through transcriptional control and selective transport mechanisms, to ensure adequate

supplies without a toxic effect in nearly all oxygen-dependent organisms (Tisato *et al.*, 2010; Jomova and Valko, 2011; Zhao *et al.*, 2014).

Copper is the third-most abundant transition metal in the human body (Pal *et al.*, 2014) with ≈80–100 mg storage (Hordyjewska *et al.*, 2014). Perturbation of the copper balance as a result of diet or disease status has been linked to various disorders (Hernández and Allende, 2008) such as genetically inherited Menkes' and Wilson's diseases; atherosclerosis; diabetes; prion (CreutzfeldtJakob) disease; in addition to Parkinson's; Huntington's and especially Alzheimer's diseases (Mocchegiani *et al.*, 2012a; Scheiber *et al.*, 2014). Copper excess is actually more widespread in the human population than its deficiency; maybe partially because of the high intake of copper inorganic ions consumed in mineral and vitamin supplements and Cu-plumbing drinking

* Correspondence to: Talita Carneiro Brandão Pereira and Maurício Reis Bogo, Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, PUCRS- porto Alegre Brasil. Av. Ipiranga, 6681. CEP 90619-900. Porto Alegre, Brazil.
E-mail: talitapereira@gmail.com; mbogo@pucrs.br

^aPrograma de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Porto Alegre, Brasil

^bLaboratório de Biologia Genômica e Molecular, PUCRS, Porto Alegre, Brasil

^cInstituto de Toxicologia e Farmacologia, PUCRS, Porto Alegre, Brasil

^dPrograma de Pós-Graduação em Odontologia, PUCRS, Porto Alegre, Brasil

^ePrograma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Porto Alegre, Brasil

CAPÍTULO III - Artigo Original

“SIRT1 is required to subdue acute inflammatory responses in zebrafish”

Talita Carneiro Brandão Pereira
Katrin Henke
Carlos Eduardo Leite
Laura Roesler Nery
David A. Sinclair
Maria Martha Campos
Matthew P. Harris
Mauricio Reis Bogo

Original Article | *In preparation*

Title

SIRT1 is required to subdue acute inflammatory responses in zebrafish

Authors and Affiliations

Talita Carneiro Brandão Pereira^{1,2,3,4,5}, Katrin Henke^{3,4}, Carlos Eduardo Leite⁷, Laura Roesler Nery⁶, David A. Sinclair⁴, Maria Martha Campos^{1,7,8}, Matthew P. Harris^{3,4}, Mauricio Reis Bogo^{1,2,6,7}.

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS - Porto Alegre, RS, Brasil

²Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, PUCRS - Porto Alegre, RS, Brasil

³Department of Genetics, Harvard Medical School - Boston, MA, USA

⁴Department of Orthopaedic Research, Boston Children's Hospital - Boston, MA, USA

⁵The Paul F. Glenn Laboratories for the Biological Mechanisms of Aging, Department of Genetics, Harvard Medical School - Boston, MA, USA.

⁶Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS - Porto Alegre, RS, Brasil

⁷Instituto de Toxicologia e Farmacologia, PUCRS - Porto Alegre, RS, Brasil

⁸Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCRS - Porto Alegre, RS, Brasil

Abstract

Inflammation is an essential multifactorial response aiming to maintain tissue homeostasis and becomes deleterious if sustained long-term. Chronic inflammation is a common denominator of most, if not all, chronic pathological conditions with robust implications on metabolic disorders and aging-related diseases. The NAD⁺-dependent histones deacylases family, the sirtuins, have been associated in this scenario as master regulators of inflammation and interconnected processes such as oxidative stress. Using zebrafish as model organism we report the effects of copper-induced inflammation on larval behavior, expression of all sirtuin-related genes, as well as on markers of inflammation, oxidative stress and apoptosis. To further investigate sirtuin contribution to this scenario, we developed the first Crispr/Cas9 knockout line for a sirtuin member that resulted in a adult viable vertebrate inbred line for *sirt1*^{-/-}, the most studied family member. Results show an enhanced inflammatory response on *sirt1*^{-/-} mutant zebrafish larvae after inflammatory stimulus, suggesting that SIRT1 acts as a mitigator of copper-induced inflammation in zebrafish. Further studies will help to explore SIRT1 contribution in multiple associated processes, and when combined with zebrafish tractability for high-throughput scale, may accelerate finest breakthrough in sirtuins biology, modulation and targets using a full whole-organism knockout.

Keywords

Copper-induced inflammation; sirtuins; SIRT1; zebrafish; Crispr/Cas9; inflammation.

Artigo em preparação. Dados não publicados sob proteção.

Acknowledgments

The authors have no conflict of interest to declare and would like to acknowledge lab funding agencies *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES), *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) and *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul* (FAPERGS).

Furthermore, we thank lab colleagues for daily assistance and discussion contributions. T.C.B.P. is recipient of PhD-fellowship from CAPES and was a visiting fellow through scientific mobility program supported by CAPES (*Programa de Doutorado-Sanduíche no Exterior*) and Lemann Institute for Brazilian Studies. M.M.C. and M.R.B are Research Career Awardees from CNPq.

References

- Barger, Jamie L., Rozalyn M. Anderson, Michael A. Newton, Cristina da Silva, James A. Vann, Thomas D. Pugh, Shinichi Someya, Tomas A. Prolla, and Richard Weindruch. "A Conserved Transcriptional Signature of Delayed Aging and Reduced Disease Vulnerability Is Partially Mediated by SIRT3." *Plos One* 10, no. 4 (2015): e0120738. doi: 10.1371/journal.pone.0120738.
- Boutant, Marie, and Carles Cantó. "SIRT1 Metabolic Actions: Integrating Recent Advances from Mouse Models." *Molecular Metabolism* 3, no. 1 (2014): 5–18. doi:10.1016/j.molmet.2013.10.006.
- Brittijn, Sebastiaan A., Suzanne J. Duivesteijn, Mounia Belmamoune, Laura F M Bertens, Wilbert Bitter, Joost D. De Bruijn, Danielle L. Champagne, et al. "Zebrafish Development and Regeneration: New Tools for Biomedical Research." *International Journal of Developmental Biology* 53, no. 5–6 (2009): 835–50. doi:10.1387/ijdb.082615sb.
- Bustin, Stephen A., Vladimir Benes, Jeremy Garson, Jan Hellemans, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, et al. "The Need for Transparency and Good Practices in the qPCR Literature." *Nature Methods* 10, no. 11 (2013): 1063–67. doi:10.1038/nmeth.2697.
- Bustin, Stephen A., Vladimir Benes, Jeremy A. Garson, Jan Hellemans, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, et al. "The MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments." *Clinical Chemistry* 55, no. 4 (2009): 611–22. doi:10.1373/clinchem.2008.112797.
- d'Alencon, C A, O A Pena, C Wittmann, V E Gallardo, R A Jones, F Loosli, U Liebel, C Grabher, and M L Allende. "A High-Throughput Chemically Induced Inflammation Assay in Zebrafish." *BMC Biol* 8, no. 1 (2010): 151. doi:10.1186/1741-7007-8-151.
- de Oliveira, Giovanna Medeiros Tavares, Luiza Wilges Kist, Talita Carneiro Brandão Pereira, Josiane Woutheres Bortolotto, Francisco Lima Paquete, Elisa Magno Nunes de Oliveira, Carlos Eduardo Leite, et al. "Transient Modulation of Acetylcholinesterase Activity Caused by Exposure to Dextran-Coated Iron Oxide Nanoparticles in Brain of Adult Zebrafish." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 162 (2014): 77–84. doi:10.1016/j.cbpc.2014.03.010.
- Feng, Y, and P Martin. "Imaging Innate Immune Responses at Tumour Initiation: New Insights from Fish and Flies." *Nat Rev Cancer* 15, no. 9 (2015): 556–62. doi:10.1038/nrc3979.
- Franceschi, C., and J. Campisi. "Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases." *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 69, no. Suppl 1 (2014): S4–9. doi:10.1093/gerona/glu057.
- Gomes, Pedro, Tiago Fleming Outeiro, and Cláudia Cavadas. "Emerging Role of Sirtuin 2 in the Regulation of Mammalian Metabolism" 36, no. 11 (2015): 756–68. doi:10.1016/j.tips.2015.08.001.

- Haverroth, Gabriela M B, Chariane Welang, Rici??ri N. Mocelin, Daniela Postay, Kanandra T. Bertoncello, Francini Franscescon, Denis B. Rosemberg, Jacir Dal Magro, and Cristiane L. Dalla Corte. "Copper Acutely Impairs Behavioral Function and Muscle Acetylcholinesterase Activity in Zebrafish (*Danio Rerio*)." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 122 (2015): 440–47. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.09.012.
- Hernandez, P. P., Allende, M. L. "Zebrafish (*Danio Rerio*) as a Model for Studying the Genetic Basis of Copper Toxicity , Deficiency , and Metabolism 1 – 4." *Am J Clin Nutr* 88 (2008): 835S – 9S.
- Hirschev, Matthew D., and Yingming Zhao. "Metabolic Regulation by Lysine Malonylation, Succinylation, and Glutarylation." *Molecular & Cellular Proteomics* 14, no. 9 (2015): 2308–15. doi:10.1074/mcp.R114.046664.
- Hwang, W Y, Y Fu, D Reyon, M L Maeder, S Q Tsai, J D Sander, R T Peterson, J R Yeh, and J K Joung. "Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system". *Nat Biotechnol*, v. 31, n. 3, p. 227--229, 2013.
- Jao, Li-en, Susan R Wentz, and Wenbiao Chen. "Efficient Multiplex Biallelic Zebrafish Genome Editing Using a CRISPR Nuclease System." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, no. 34 (2013): 13904–9. doi: 10.1073/pnas.1308335110.
- Johnson, A, E Carew, and K A Sloman. "The Effects of Copper on the Morphological and Functional Development of Zebrafish Embryos." *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 84, no. 4 (2007): 431–38. doi:10.1016/j.aquatox.2007.07.003.
- Kauppinen, A, T Suuronen, J Ojala, K Kaarniranta, and A Salminen. "Antagonistic Crosstalk between NF-kappaB and SIRT1 in the Regulation of Inflammation and Metabolic Disorders." *Cell Signal* 25, no. 10 (2013): 1939–48. doi:10.1016/j.cellsig.2013.06.007.
- Kiran, Shashi, Tarique Anwar, Manjari Kiran, and Gayatri Ramakrishna. "Sirtuin 7 in Cell Proliferation, Stress and Disease: Rise of the Seventh Sirtuin!" *Cellular Signalling* 27, no. 3 (2015): 673–82. doi:10.1016/j.cellsig.2014.11.026.
- Le Guyader, Dorothée, Michael J Redd, Emma Colucci-Guyon, Emi Murayama, Karima Kissa, Valérie Briolat, Elodie Mordelet, Agustin Zapata, Hiroto Shinomiya, and Philippe Herbomel. "Origins and Unconventional Behavior of Neutrophils in Developing Zebrafish." *Blood* 111, no. 1 (2008): 132–41. doi:10.1182/blood-2007-06-095398.
- Leite, Carlos Eduardo, Ariane da Cruz Teixeira, Fernanda Fernandes Cruz, Simone Cervieri Concatto, Jefferson Henrich Amaral, Carla Denise Bonan, Maria Martha Campos, Fernanda Bueno Morrone, and Ana Maria Oliveira Battastini. "Analytical Method for Determination of Nitric Oxide in Zebrafish Larvae: Toxicological and Pharmacological Applications." *Analytical Biochemistry* 421, no. 2 (2012): 534–40. doi:10.1016/j.ab.2011.11.038.
- Leite, Carlos Eduardo, Lucas de Oliveira Maboni, Fernanda Fernandes Cruz, Denis Brock Rosemberg, Fernanda Francine Zimmermann, Talita Carneiro Brandão Pereira, Maurício Reis Bogó, et al. "Involvement of Purinergic System in Inflammation and Toxicity Induced by Copper in Zebrafish Larvae." *Toxicology and Applied Pharmacology* 272, no. 3 (2013): 681–89. doi:10.1016/j.taap.2013.08.001.
- Liu, T. F., C. M. Brown, M. El Gazzar, L. McPhail, P. Millet, A. Rao, V. T. Vachharajani, B. K. Yoza, and C. E. McCall. "Fueling the Flame: Bioenergy Couples Metabolism and Inflammation." *Journal of Leukocyte Biology* 92, no. 3 (2012): 499–507. doi:10.1189/jlb.0212078.
- Liu, Tie Fu, Vidula Vachharajani, Patrick Millet, Manish S. Bharadwaj, Anthony J. Molina, and Charles E. McCall. "Sequential Actions of SIRT1-RELB-SIRT3 Coordinate Nuclear-Mitochondrial Communication during Immunometabolic Adaptation to Acute Inflammation and Sepsis." *Journal of Biological Chemistry* 290, no. 1 (2015): 396–408. doi:10.1074/jbc.M114.566349.
- Medzhitov, Ruslan. "Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame." *Cell* 140, no. 6 (2010): 771–76. doi:10.1016/j.cell.2010.03.006.

- Meeker, Nathan D, Sarah A Hutchinson, Linh Ho, and Nikolaus S Trede. "Method for Isolation of PCR-Ready Genomic DNA from Zebrafish Tissues." *BioTechniques* 43, no. 5 (2007): 610, 612, 614. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18072590>.
- Meeker, Nathan D., and Nikolaus S. Trede. "Immunology and Zebrafish: Spawning New Models of Human Disease." *Developmental and Comparative Immunology* 32, no. 7 (2008): 745–57. doi:10.1016/j.dci.2007.11.011.
- Novoa, Beatriz, and Antonio Figueras. "Current Topics in Innate Immunity II." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 946 (2012): 253–75. doi:10.1007/978-1-4614-0106-3.
- O'Neill, Luke A. J., and D. Grahame Hardie. "Metabolism of Inflammation Limited by AMPK and Pseudo-Starvation." *Nature* 493, no. 7432 (2013): 346–55. doi:10.1038/nature11862.
- Opitz, Christiane A, and Ines Heiland. "Dynamics of NAD-Metabolism: Everything but Constant." *Biochemical Society Transactions* 43, no. 6 (2015): 1127–32. doi:10.1042/BST20150133.
- Pais, Teresa Faria, Éva M Szegő, Oldriska Marques, Leonor Miller-Fleming, Pedro Antas, Patrícia Guerreiro, Rita Machado de Oliveira, Burcu Kasapoglu, and Tiago Fleming Outeiro. "The NAD-Dependent Deacetylase Sirtuin 2 Is a Suppressor of Microglial Activation and Brain Inflammation." *The EMBO Journal* 32, no. 19 (2013): 2603–16. doi:10.1038/emboj.2013.200.
- Palomer, Xavier, Laia Salvadó, Emma Barroso, and Manuel Vázquez-Carrera. "An Overview of the Crosstalk between Inflammatory Processes and Metabolic Dysregulation during Diabetic Cardiomyopathy." *International Journal of Cardiology* 168, no. 4 (2013): 3160–72. doi:10.1016/j.ijcard.2013.07.150.
- Pereira, Talita Carneiro Brandão, Eduardo Pacheco Rico, Denis Broock Rosemberg, Helena Schirmer, Renato Dutra Dias, André Arigony Souto, Carla Denise Bonan, and Maurício Reis Bogo. "Zebrafish as a Model Organism to Evaluate Drugs Potentially Able to Modulate Sirtuin Expression." *Zebrafish* 8, no. 1 (2011): 9–16. doi:10.1089/zeb.2010.0677.
- Pereira, Talita Carneiro Brandão, Maria Martha Campos, Mauricio Reis Bogo. "Copper toxicology, oxidative stress and inflammation using zebrafish as experimental model". *Journal of Applied Toxicology* (2016) *In press*.
- Poulose, Ninu, and Raghavan Raju. "Sirtuin Regulation in Aging and Injury." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1852, no. 11 (2015): 2442–55. doi:10.1016/j.bbadis.2015.08.017.
- Price, Nathan L, Ana P Gomes, Alvin J Y Ling, Filipe V Duarte, Alejandro Martin-montalvo, Brian J North, Beamon Agarwal, et al. "Article SIRT1 Is Required for AMPK Activation and the Beneficial Effects of Resveratrol on Mitochondrial Function." *Cell Metabolism* 15, no. 5 (2012): 675–90. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.003.
- Sanchez-Fidalgo, S. "Sirtuin Modulators: Mechanisms and Potential Clinical Implications." *Current Medicinal Chemistry*, (2012) 2414–41. *Senescence, Cellular*. "NIH Public Access," 2014, 1–38. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.015. REDOX.
- Shelef, Miriam A, Sebastien Tauzin, and Anna Huttenlocher. "Neutrophil Migration: Moving from Zebrafish Models to Human Autoimmunity." *Immunological Reviews* 256, no. 1 (2013): 269–81. doi:10.1111/imr.12124.
- Sonnack, Laura, Sebastian Kampe, Elke Muth-Köhne, Lothar Erdinger, Nicole Henny, Henner Hollert, Christoph Schäfers, and Martina Fenske. "Effects of Metal Exposure on Motor Neuron Development, Neuromasts and the Escape Response of Zebrafish Embryos." *Neurotoxicology and Teratology* 50 (2015) 33–42. doi:10.1016/j.ntt.2015.05.006.
- Suffredini, Anthony F. "Targeting Sirtuin to Modulate Human Inflammation" (2015) 1348–49. doi:10.1097/CCM.0000000000001030.
- Tang, Rongying, Andrew Dodd, Daniel LAI, Warren C. McNabb, and Donald R. Love. "Validation of Zebrafish (*Danio Rerio*) Reference Genes for Quantitative Real-Time RT-PCR Normalization." *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 39, no. 5 (2007): 384–90. doi:10.1111/j.1745-7270.2007.00283.x.

- Thisse, Bernard, and Christine Thisse. "In Situ Hybridization on Whole-Mount Zebrafish Embryos and Young Larvae" 1211 (2014): 53–67. doi:10.1007/978-1-4939-1459-3.
- Tilstra, Jeremy S, Cheryl L Clauson, Laura J Niedernhofer, and Paul D Robbins. "NF- κ B in Aging and Disease" 2, no. 6 (2011): 449–65.
- Vachharajani, Vidula, Tiefu Liu, and Charles E Mccall. "HHS Public Access" 10, no. 9 (2014): 1141–50. doi:10.1586/1744666X.2014.943192.
- Vakhrusheva, O, D Braeuer, Z Liu, T Braun, and E Bober. "Sirt7-Dependent Inhibition Of Cell Growth And Proliferation Might Be Instrumental To Mediate Tissue Integrity During Aging." *Journal of Physiology and Pharmacology* (2008) 201–12.
- Westerfield, M. "The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*)". (2000). 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.
- Yang, Hui, Yujing Bi, Lixiang Xue, Jian Wang, Yun Lu, Zhengguo Zhang, Xi Chen, et al. "Multifaceted Modulation of SIRT1 in Cancer and Inflammation." *Critical Reviews in Oncogenesis* 20, no. 1–2 (2015): 49–64. doi:10.1615/CritRevOncog.2014012374.
- Zhang, Ting, Lian Xu, Jun-Jie Wu, Wei-Min Wang, Jie Mei, Xu-Fa Ma, and Jing-Xia Liu. "Transcriptional Responses and Mechanisms of Copper-Induced Dysfunctional Locomotor Behavior in Zebrafish Embryos." *Toxicological Sciences* 148, no. 1 (2015): 299–310. doi:10.1093/toxsci/kfv184.

CAPÍTULO IV - Considerações Finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese teve por objetivo conectar (1) a importância das sirtuínas como reguladores metabólicos e da saúde e potenciais alvos terapêuticos; (2) a inflamação como fator comum a muitas doenças crônicas e (3) o uso do *zebrafish* como ferramenta para prospecção de novas descobertas e/ou validação *in vivo* de mecanismos associados aos tópicos supracitados. Contudo, a caracterização deste grupo de enzimas no modelo é um passo essencial e anterior a sua aplicação como ferramenta. Este trabalho portanto, não apenas contribui como base de novos estudos, como disponibiliza um novo modelo, visando fundamentalmente usufruir do potencial translacional do *zebrafish*.

Utilizando um modelo de inflamação por indução via sulfato de cobre em linhagem nocaute para SIRT1, mostramos a presença de uma resposta inflamatória exacerbada em sua ausência. Avaliação complementar da expressão de diferentes alvos da SIRT1, bem como de marcadores de inflamação e estresse oxidativo no mutante darão robustez aos resultados, uma vez que tentativas de avaliar níveis proteicos de SIRT1 e de NF- κ B (utilizando diferentes anticorpos para SIRT1 de mamíferos) foram infrutíferas. Concomitantemente, avaliar a expressão gênica das demais SIRTs, para investigar possíveis mecanismos compensatórios, permitirá uma visão mais global do comportamento dos demais membros da família na ausência da principal SIRT no processo inflamatório.

Assim, os resultados aqui apresentados corroboram achados em outros organismos, comprometendo as sirtuínas na regulação do processo inflamatório, ainda que utilizando um agente inflamatório diferente. De fato, o uso do sulfato de cobre permitiu uma abordagem de inflamação estéril, e como discutido no artigo de revisão aqui apresentado, o desbalanço na regulação dos níveis de cobre no organismo são parte das respostas inflamatórias e estão sendo cada vez mais associadas a diferentes doenças crônicas neurodegenerativas. Por outro lado, a diminuição da expressão de SIRT1 também já foi associada a diversas condições associadas ao envelhecimento. Considerando ainda que grande parte destas doenças possuem componente inflamatório importante e que os mutantes *sirt1^{-/-}* desenvolvidos neste trabalho são mais suscetíveis a indução de resposta inflamatória, avaliar os mecanismos subjacentes tornou-se imperativo e um promissor desdobramento deste trabalho.

Por último, alterações no padrão de expressão gênica de SIRT3.2, e não de sua paróloga SIRT3, após indução de inflamação, também se destaca. Com apenas um relato na literatura descrevendo sua identificação, o desenvolvimento de uma linhagem nocaute para SIRT3.2 já está em andamento e será essencial para esclarecer o papel que esta duplicação gênica possui no *zebrafish*.

Aliado a este contexto, a combinação de cenários de perda e ganho de função do mesmo gene paralelamente permitirá experimentos *proof-of-concept*, apresentando o contra-ponto da condição alvo. Esta abordagem comparativa pode ser realizada ainda através de controle farmacológico das moléculas chave e, neste sentido, uma série de ativadores e (em menor grau) de inibidores, tem sido descritos para as SIRTs permitindo o direcionamento de resultados moleculares à uma visão global funcional. Por outro lado, desenvolvimento de linhagens transgênicas podem facilitar a visualização de possíveis respostas sistêmicas, aproveitando uma das principais vantagens do *zebrafish*.

REFERÊNCIAS

- ALHAZZAZI, T. et al. SIRT3 and cancer: tumor promoter or suppressor? Biochim Biophys Acta, v. 1816, n.1, Ago, p. 80-8. 2011.
- BARROS-BECKER, F. et al. Persistent oxytetracycline exposure induces an inflammatory process that improves regenerative capacity in zebrafish larvae. PLoS One, v. 7, n. 5, p. 36827. 2012.
- BAUR, J. A. et al. Are sirtuins viable targets for improving healthspan and lifespan? Nat Rev Drug Discov, v. 11, n. 6, Jun, p. 443-61. 2012.
- BEAUHARNOIS, J. et al. Sirtuin 6: a review of biological effects and potential therapeutic properties. Molecular bioSystems, v. 9, n. 7, p. 1789--806, 2013. ISSN 1742-2051 (Electronic) 1742-2051.
- BLANDER, G.; GUARENTE, L. The Sir2 family of protein deacetylases. Annu Rev Biochem, v.73, p.417-35. 2004.
- BRACHMANN, C., SHERMAN, J.; et al. The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. Genes Dev, v.9, n.23, Dec, p.2888-902. 1995.
- BRITTIJN, S. A. et al. Zebrafish development and regeneration: new tools for biomedical research. Int J Dev Biol, v. 53, n. 5-6, p. 835-50. 2009.
- CANNIZZO, E. S. et al. Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence. J Proteomics, v. 74, n. 11, Oct, p. 2313-23. 2011.
- CHANG, J.; Kim, H.; et al. Structural basis for the NAD-dependent deacetylase mechanism of Sir2. J Biol Chem, v.277, n.37, Sep, p.34489-98. 2002.
- CHONG, Z. et al. SIRT1: new avenues of discovery for disorders of oxidative stress. Expert Opin Ther Targets, v. 16, n. 2, Feb, p. 167-78. 2012.
- CROLLIUS, H.; WEISSENBACH, J. Fish genomics and biology. Genome Res, v.15, n.12, Dec, p.1675-82. 2005.
- COLWILL, R; CRETON, R. Locomotor behaviors in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. Behav Processes, v. 86, n.2, Fev, p. 222-9. 2011.
- D'AQUILA, P. et al. SIRT3 gene expression: a link between inherited mitochondrial DNA variants and oxidative stress. Gene, v. 497, n. 2, Apr, p. 323-9. 2012.
- DANG, W. The controversial world of sirtuins. Drug Discovery Today: Technologies, v. 12, p. e9--e17, 2014.
- DE RUIJTER, A.; VAN GENNIP, A.; et al. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. Biochem J, v.370, n.Pt 3, Mar, p.737-49. 2003.
- DENU, J. The Sir 2 family of protein deacetylases. Curr Opin Chem Biol, v.9, n.5, Oct, p. 431-40. 2005.

DOOLEY, K.; ZON, L. Zebrafish: a model system for the study of human disease. Curr Opin Genet Dev, v.10, n.3, Jun, p.252-6. 2000.

DOUDNA, J. Charpentier, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science, v. 346, n. 6213, p. 1258096-1258096, 2014.

EIMON, P. M.; ASHKENAZI, A. The zebrafish as a model organism for the study of apoptosis. Apoptosis, v. 15, n. 3, Mar, p. 331-49. 2010.

FANG, L.; MILLER, Y. I. Emerging applications for zebrafish as a model organism to study oxidative mechanisms and their roles in inflammation and vascular accumulation of oxidized lipids. Free Radic Biol Med, v. 53, n. 7, Aug, p. 1411-1420. 2012.

FRYE, R. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. Biochem Biophys Res Commun, v.260, n.1, Jun, p.273-9. 1999.

_____. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. Biochem Biophys Res Commun, v.273, n.2, Jul, p.793-8. 2000.

GAGNON, et al. Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs. PLoS ONE, v. 9, n. 5, p. 5-12, 2014.

GALLÍ, M.; VAN GOOL, F.; LEO, O. Sirtuins and inflammation: Friends or foes? Biochem Pharmacol, v. 81, n. 5, Mar, p. 569-76. 2011.

GALLINARI, P.; DI MARCO, S.; et al. HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. Cell Res, v.17, n.3, Mar, p.195-211. 2007.

GAN, L.; MUCKE, L. Paths of convergence: sirtuins in aging and neurodegeneration. Neuron, v.58, n.1, Apr, p.10-4. 2008.

GERHARD, G. Comparative aspects of zebrafish (*Danio rerio*) as a model for aging research. Exp Gerontol, v.38, n.11-12, 2003 Nov-Dec, p.1333-41. 2003.

GERHARD, G.; CHENG, K. A call to fins! Zebrafish as a gerontological model. Aging Cell, v. 1, n.2, Dec, p.104-11. 2002.

GERLAI, R; LAHAV, M; et al. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. Pharmacol Biochem Behav. v. 67, n.4, Dec, p. 773-82. 2000.

GIRALT, A.; VILLARROYA, F. SIRT3, a pivotal actor in mitochondrial functions: metabolism, cell death and aging. Biochem J, v. 444, n. 1, May, p. 1-10. 2012.

GONZALES, A. et al. Cas9-based genome editing in Zebrafish. Elsevier Inc., 1, 377–413. 2014.

GREGORETTI, I.; LEE, Y.; et al. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. J Mol Biol, v.338, n.1, Apr, p.17-31. 2004.

GREISS, S.; GARTNER, A. Sirtuin/Sir2 phylogeny, evolutionary considerations and structural conservation. Mol Cells, v. 28, n. 5, Nov, p. 407-15. 2009.

- GUO, S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? Genes Brain Behav, v.3, n.2, Apr, p.63-74. 2004.
- HAIGIS, M.; MOSTOSLAVSKY, R.; et al. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. Cell, v.126, n.5, Sep, p. 941-54. 2006.
- HAMMES, T. O. et al. The effect of taurine on hepatic steatosis induced by thioacetamide in zebrafish (*Danio rerio*). Dig Dis Sci, v. 57, n. 3, Mar, p. 675-82. 2012.
- HILL, A.; TERAOKA, H.; et al. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. Toxicol Sci, v.86, n.1, Jul, p.6-19. 2005.
- HILDMANN, C.; RIESTER, D.; et al. Histone deacetylases--an important class of cellular regulators with a variety of functions. Appl Microbiol Biotechnol, v.75, n.3, Jun, p.487-97. 2007.
- HIRSCHEY, M. D. A. Z. Y. Metabolic Regulation by Lysine Malonylation, Succinylation, and Glutarylation. Molecular & Cellular Proteomics, v. 14, n. 9, p. 2308--2315, 2015.
- HISANO, Y et al. Precise in-frame integration of exogenous DNA mediated by CRISPR/Cas9 system in zebrafish. Scientific reports, v. 5, p. 8841, 2015.
- HOLBERT, M.; MARMORSTEIN, R. Structure and activity of enzymes that remove histone modifications. Curr Opin Struct Biol, v.15, n.6, Dec, p.673-80. 2005.
- HORIO, Y. et al. Cellular and molecular effects of sirtuins in health and disease. Clin Sci, v. 121, n. 5, Sep, p. 191-203. 2011.
- HOUTKOOOPER, R. H.; PIRINEN, E.; AUWERX, J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. Nat Rev Mol Cell Biol, v. 13, Apr, n. 4, p. 225-38. 2012.
- HSU, P. et al. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell, v. 157, n. 6, p. 1262--1278, 2014.
- HWANG, W. et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. Nat Biotechnol, v. 31, n. 3, p. 227--229, 2013.
- IMAI, S.; ARMSTRONG, C.; et al. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. Nature, v.403, n.6771, Feb, p.795-800. 2000.
- IMAI, S.; GUARENTE, L. Ten years of NAD-dependent SIR2 family deacetylases: implications for metabolic diseases. Trends Pharmacol Sci, v. 31, n. 5, May, p. 212-20. 2010.
- IMAI, S, Guarante, L. NAD⁺ and sirtuins in aging and disease. Trends in Cell Biology, v. 24, n. 8, p. 464--471, 2014.
- INOUE, T. et al. The molecular biology of mammalian SIRT proteins: SIRT2 in cell cycle regulation. Cell Cycle, v. 6, n. 9, May, p. 1011-8. 2007.
- JONES, K.; ALIMOV A.; et al. A high throughput live transparent animal bioassay to identify non-toxic small molecules or genes that regulate vertebrate fat metabolism for obesity drug development. Nutr Metab, v.27, n.5, Aug, p.23. 2008.

- KAWAHARA, T. L. et al. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. Cell, v. 136, n. 1, Jan, p. 62-74. 2009.
- KLAR, A.; SEYMOUR, F.; et al. MAR1-A regulator of the HMa and HMα locus in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 93, 37–50. 1979.
- KELLER, E.; MURTHA, J. The use of mature zebrafish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease. Comp Biochem Physiol C 138, 335–341. 2004.
- KELLY, G. A review of the sirtuin system, its clinical implications, and the potential role of dietary activators like resveratrol: part 1. Altern Med Rev, v. 15, n. 3, Sep . p. 245-63. 2010.
- KIM, W, Kim J. SIRT7 an emerging Sirtuin: Deciphering newer roles. Journal of Physiology and Pharmacology, v. 64, n. 5, p. 531--534, 2013.
- KOK, F, et al. Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. Developmental Cell, v. 32, n. 1, p. 97--108, 2015.
- LANDRY, J.; SLAMA, J.; et al. Role of NAD(+) in the deacetylase activity of the SIR2-like proteins. Biochem Biophys Res Commun, v.278, n.3, Nov, p.685-90. 2000.
- LEI AROUCA: Lei nº 11.794, de outubro de 2008. Lei Federal. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm> Acesso em: Agosto de 2012.
- LEITE, C.E. et al.. Involvement of purinergic system in inflammation and toxicity induced by copper in zebrafish larvae. Toxicology and Applied Pharmacology, v.272, p.681 – 689. 2013.
- LEITE, C. E. et al. Analytical method for determination of nitric oxide in zebrafish larvae: toxicological and pharmacological applications. Anal Biochem, v. 421, n. 2, p. 534-40. 2012.
- LIN, H. Nicotinamide adenine dinucleotide: beyond a redox coenzyme. Org Biomol Chem, v.5, n.16, Aug, p.2541-54. 2007.
- MAHLKNECHT, U.; ZSCHOERNIG, B. Involvement of sirtuins in life-span and aging related diseases. Adv Exp Med Biol, v. 739, p. 252-61. 2012.
- MCGUINNESS, D. et al. Sirtuins, bioageing, and cancer. J Aging Res, v. 2011, p. 235754. 2011.
- MEEKER, N. D.; TREDE, N. S. Immunology and zebrafish: spawning new models of human disease. Dev Comp Immunol, v. 32, n. 7, p. 745-57. 2008.
- MICHAN, S.; SINCLAIR, D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. Biochem J, v.404, n.1, May, p.1-13. 2007.
- MILNE, J.; DENU, J. The Sirtuin family: therapeutic targets to treat diseases of aging. Curr Opin Chem Biol, v.12, n.1, Feb, p.11-7. 2008.

MONIOT, S.; WEYAND, M.; STEEGBORN, C. Structures, substrates, and regulators of Mammalian sirtuins - opportunities and challenges for drug development. Front Pharmacol, v. 3, p. 16. 2012

MORRISON, B.; MAJDZADEH, N.; et al. Histone deacetylases: focus on the nervous system. Cell Mol Life Sci, v.64, n.17, Sep, p.2258-69. 2007.

NATOLI, G. When sirtuins and NF-kappaB collide. Cell, v. 136, n. 1, Jan, p. 19-21. 2009.

NORNES, S. et al. Developmental control of Presenilin1 expression, endoproteolysis, and interaction in zebrafish embryos. Exp Cell Res, v. 289, n. 1, Sep, p. 124-32. 2003.

OGGIER, D. M. et al. Effects of diazepam on gene expression and link to physiological effects in different life stages in zebrafish (*Danio rerio*). Environ Sci Technol, v. 44, n. 19, Oct, p. 7685-91. 2010.

OSBORNE, B. et al. Are sirtuin deacetylase enzymes important modulators of mitochondrial energy metabolism? Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, v. 1840, n. 4, p. 1295--1302, 2014.

OTA, H. et al. SIRT1/eNOS axis as a potential target against vascular senescence, dysfunction and atherosclerosis. J Atheroscler Thromb, v. 17, n. 5, May, p. 431-5. 2010.

OUTEIRO, T.; MARQUES, O.; et al. Therapeutic role of sirtuins in neurodegenerative disease. Biochim Biophys Acta, v.1782, n.6, Jun, p.363-9. 2008.

PAIS, T.F. et al. The NAD-dependent deacetylase sirtuin 2 is a suppressor of microglial activation and brain inflammation. EMBO. v. 32, n. 19, Oct, p. 2603-16. 2013.

PEREIRA, T. C. et al. Zebrafish as a model organism to evaluate drugs potentially able to modulate sirtuin expression. Zebrafish, v. 8, n. 1, Mar, p. 9-16. 2011.

PETERSON, R. T.; MACRAE, C. A. Systematic approaches to toxicology in the zebrafish. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v. 52, Feb, p. 433-53. 2012.

PREYAT, N, Leo,O. Sirtuin deacetylases: a molecular link between metabolism and immunity. Journal of leukocyte biology, v. 93, n. 5, p. 669--80, 2013.

PORCU, M.; CHIARUGI, A. The emerging therapeutic potential of sirtuin-interacting drugs: from cell death to lifespan extension. Trends Pharmacol Sci, v.26, n.2, Feb, p.94-103. 2005.

POTENTE, M.; DIMMELER, S. Emerging roles of SIRT1 in vascular endothelial homeostasis. Cell Cycle, v.7, n.14, Jul, p.2117-22. 2008.

PYATI, U. J.; LOOK, A. T.; HAMMERSCHMIDT, M. Zebrafish as a powerful vertebrate model system for in vivo studies of cell death. Semin Cancer Biol, v. 17, n. 2, Apr, p. 154-65. 2007.

RAJENDRAN, R. et al. Sirtuins: molecular traffic lights in the crossroad of oxidative stress, chromatin remodeling, and transcription. J Biomed Biotechnol, v. 2011, p. 368276. 2011.

RENSHAW, S. A.; TREDE, N. S. A model 450 million years in the making: zebrafish and vertebrate immunity. Dis Model Mech, v. 5, n. 1, Jan, p. 38-47. 2012.

- RINE, J.; HERSKOWITZ, I. Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, v.116, n.1, May, p.9-22. 1987.
- ROSSI, A. et al. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. Nature, v. Aug 13, n. 524, p. 230--3, 2015.
- SANCHEZ-FIDALGO, S. et al. Sirtuin modulators: mechanisms and potential clinical implications. Curr Med Chem, v. 19, n. 15, p. 2414-41. 2012.
- SANDERS, B. D.; JACKSON, B.; MARMORSTEIN, R. Structural basis for sirtuin function: what we know and what we don't. Biochim Biophys Acta, v. 1804, n. 8, Aug, p. 1604-16. 2010.
- SAUNDERS, L.; VERDIN, E. Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. Oncogene, v.26, n.37, Aug, p.5489-504. 2007.
- SANDER, J, Joung, K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. Nature biotechnology, v. 32, n. 4, p. 347--55, 2014.
- SAUVE, A.; WOLBERGER, C.; et al. The biochemistry of sirtuins. Annu Rev Biochem, v.75, p.435-65. 2006.
- SAUVE, A. A. Sirtuin chemical mechanisms. Biochim Biophys Acta, v. 1804, n. 8, Aug, p. 1591-603. 2010.
- SCHIRMER, H. et al. Modulatory effect of resveratrol on SIRT1, SIRT3, SIRT4, PGC1 α and NAMPT gene expression profiles in wild-type adult zebrafish liver. Mol Biol Rep, v. 39, n. 3, Mar, p. 3281-9. 2012.
- SHIN, J.; FIDMAN, C. From zebrafish to human: modular medical models. Annu Rev Genomics Hum Genet, v.3, p.311-340. 2002.
- SHINMURA, K. et al. Caloric restriction primes mitochondria for ischemic stress by deacetylating specific mitochondrial proteins of the electron transport chain. Circ Res, v. 109, n. 4, Aug, p. 396-406. 2011.
- SMITH, J.; BRACHMANN, C.; et al. A phylogenetically conserved NAD⁺-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. Proc Natl Acad Sci EUA, v.97, n.12, Jun, p. 6658-63. 2000.
- SPENCE, G.; LAWRENCE, C.; et al. The behaviour and ecology of the zebrafish (*Danio rerio*). Biological Reviews, v.83, n.1, p.13-34. 2008.
- STAINIER, D. et al. Making sense of anti-sense data. Developmental Cell, v. 32, n. 1, p. 7--8, 2015.
- STÜNKEL, W.; CAMPBELL, R. M. Sirtuin 1 (SIRT1): the misunderstood HDAC. J Biomol Screen, v. 16, n. 10, Dec, p. 1153-69. 2011.
- TILSTRA, J. S. et al. NF- κ B in Aging and Disease. Aging Dis, v. 2, n. 6, Dec, p. 449-65. 2011.
- TONG, L. Denu, J. Function and metabolism of sirtuin metabolite O-acetyl-ADP-ribose. Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics, v. 1804, n. 8, p. 1617-1625, 2010.

- VAKHRUSHEVA, O. et al. Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. Circ Res, v. 102, n. 6, Mar, p. 703-10. 2008.
- VAN BEBBER, F. et al. Methylene blue fails to inhibit Tau and polyglutamine protein dependent toxicity in Zebrafish. Neurobio of Dis, v. 39, p. 265-271, 2010.
- VARSHNEY, G. et al. High-throughput gene targeting and phenotyping in zebrafish using CRISPR/Cas9. Genome Research, v. 25, n. 7, p. 1030--1042, 2015.
- VERDIN, E. et al. Sirtuin regulation of mitochondria: energy production, apoptosis, and signaling. Trends Biochem Sci, v. 35, n. 12, Dec, p. 669-75. 2010.
- VERDIN, E. NAD⁺ in aging, metabolism, and neurodegeneration. Science, v. 350, n. 6265, p. 1208--1213, 2015.
- WANG, Y.; LIANG, Y.; VANHOUTTE, P. M. SIRT1 and AMPK in regulating mammalian senescence: a critical review and a working model. FEBS Lett, v. 585, n. 7, Apr , p. 986-94. 2011.
- WESTERFIELD, M. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). Eugene: University of Oregon Press, 2000. Disponível em: <http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html> Acesso em: Agosto de 2012.
- WESTPHAL, C.; DIPP, M.; et al. A therapeutic role for sirtuins in diseases of aging? Trends Biochem Sci, v.32, n.12, Dec, p.555-60. 2007.
- WILSON, J. M.; BUNTE, R. M.; CARTY, A. J. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). J Am Assoc Lab Anim Sci, v. 48, n. 6, Nov, p. 785-9. 2009.
- YAMAMOTO, H., SCHOONJANS, K.; et al. Sirtuin functions in health and disease. Mol Endocrinol, v.21, n.8, Aug, p.1745-55. 2007.
- YUAN, S.; SUN, Z. Microinjection of mRNA and morpholino antisense oligonucleotides in zebrafish embryos. J Vis Exp, n. 27. 2009.
- YUAN, H. MARMORSTEIN, R. Structural basis for sirtuin activity and inhibition. Journal of Biological Chemistry, v. 287, n. 51, p. 42428--42435, 2012.
- ZENG, L. et al. Silent information regulator, Sirtuin 1, and age-related diseases. Geriatr Gerontol Int, v. 9, n. 1, Mar, p. 7-15. 2009.
- ZHANG, D.; LIU, Y.; CHEN, D. SIRT-ain relief from age-inducing stress. Aging, v. 3, n. 2, Feb, p. 158-61, 2011.
- ZON, L.; PETERSON, R. In vivo drug discovery in the zebrafish. Nat Rev Drug Discov, v.4, n. 1, Jan, p.35-44. 2005.

ANEXO I: COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA
NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 0143/12 – CEUA

Porto Alegre, 22 de novembro de 2012.

Senhor Pesquisador:

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 12/00314, “**Caracterização das sirtuinas frente à modelo de inflamação em zebrafish e avaliação de parâmetros associados à inflamação, apoptose e estresse oxidativo.**”.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,



Prof. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó
Coordenadora da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.
Prof.º. Mauricio Reis Bogo
FABIO
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314
CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO II: REQUISITOS OBRIGATÓRIOS E ATIVIDADES ADICIONAIS (2012-2016)

I. CUMPRIMENTO DOS REQUISITOS OBRIGATÓRIOS PARA DOUTORADO NO PPGMCS/PUCRS

- Publicação do artigo do mestrado (2011).
- Conclusão dos 36 créditos através de disciplinas eletivas e obrigatórias (2012)
- Execução de estágio docente, por dois semestres, na disciplina de Bioquímica Estrutural do curso de Ciências Biológicas da FABIO/PUCRS (2011/2 e 2012/1).
- Aprovação do projeto de pesquisa no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/PUCRS - Protocolo #12/00314).
- Publicação de artigo de revisão como primeiro autor em tema diretamente relacionado a tese: revista *Journal of Applied Toxicology* (qualis A2).

II. ATIVIDADES RELACIONADAS AO PROCESSO DE DOUTORAMENTO

Ila. REALIZAÇÃO DE DOUTORADO-SANDUÍCHE (2014-2015)

- Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE/CAPES; 13 meses)
Local: Harvard Medical School (Genetics Department); Harvard University, EUA
Orientadores: Dr. David A. Sinclair & Dr. Matthew P. Harris

Ilb. PARTICIPAÇÃO EM CURSOS INTERNACIONAIS DE CERTIFICAÇÃO E APERFEIÇOAMENTO TÉCNICO

- Curso teórico-prático (110h/a)
2nd LAZEN Training Course: Zebrafish husbandry protocols and state of the art experimental approaches (Rosário, Argentina; 2012).
- Curso teórico-prático (100h/a)
Optics, Forces and Development: In vivo 3-D microscopy for the analysis of cell behavior in developing embryos (Santiago, Chile; 2013).

Ilc. PARTICIPAÇÃO EM CO-AUTORIA DE ARTIGOS CIENTÍFICOS

2015

- Pereira, PJ; Machado,G; Danesi, G.; Canevese, F; Reddy, V; Pereira, TCB; Bogo, MR; Cheng,Y-C; Laedermann, C; Talbot, S; Lerner,E; Campos, MM. "GRPR/PI3Kγ:partners in central transmission of itch". *Journal of Neuroscience*, v. 35(49), p. 16272-81, 2015.
- Silva, RBM ; Sperotto, NDM; Andrade, EL; Pereira, TCB; Leite, CE; De Souza, AH ; Bogo, MR ; Morrone, FB ; Gomez, MV ; Campos, MM . "Spinal blockage of P/Q- or N-type voltage-gated calcium channels modulates functional and symptomatic changes related to haemorrhagic cystitis in mice". *British Journal of Pharmacology*, v. 172, p. 924-939, 2015.
- Scaini, G ; Morais, MOS ; Furlanetto, CB; Kist, LW; Pereira, TCB; Schuck, PF; Ferreira, GC; Pasquali, MAB; Gelain, DP; Moreira, JCF; Bogo, MR; Streck, EL. "Acute Administration of Branched-Chain Amino Acids Increases the Pro-BDNF/Total-BDNF Ratio in the Rat Brain". *Neurochemical Research*, v. 40, p. 885-93, 2015.

2014

- De Oliveira, GMT; Kist, LW; Pereira, TCB; Bortolotto, JW; Paquete, FL; De Oliveira, EMN; Leite, CE; Bonan, CD; De Souza-Basso, NG; Papaleo, RM Bogo, MR. "Transient modulation of acetylcholinesterase activity caused by exposure to dextran-coated iron oxide nanoparticles in brain of adult zebrafish." *Comparative Biochemistry and Physiology. C. Toxicology & Pharmacology*, v. 162, p. 77-84, 2014.

- Maciel, IS; Azevedo, VM; Pereira, TCB; Bogó, MR; Souza, AH; Gomez, MV; Campos, MM. "The spinal inhibition of N-type voltage-gated calcium channels selectively prevents scratching behavior in mice". *Neuroscience*, v. 277, p. 794-805. 2014.
- Nery, LR; Eltz, NS; Martins, L; Guerim, LD; Pereira, TCB; Bogó, MR; Vianna, MRM. "Sustained behavioral effects of lithium exposure during early development in zebrafish: Involvement of the Wnt- β -catenin signaling pathway." *Progress in NeuroPsychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 55, p. 101-108, 2014.
- Ferreira, GK; Scaini, G; Jeremias, IC; Carvalho-Silva, M; Gonçalves, CL; Pereira, TCB; Oliveira, GMT; Kist, LW; Bogó, MR; SCHUCK, PF; Ferreira, GC; Streck, EL. "An Evaluation of the Effects of Acute and Chronic L-Tyrosine Administration on BDNF Levels and bdnf mRNA Expression in the Rat Brain". *Molecular Neurobiology*, v. 49, p. 734-740, 2014.
- Nicoletti, NF; Erig, TTC; Zanin, RF; Pereira, TCB; Bogó, MR; Campos, MM; Morrone, FB. "Mechanisms involved in kinin-induced glioma cells proliferation: the role of ERK1/2 and PI3K/Akt pathways". *Journal of Neuro-Oncology*, v. 120, p. 235-244, 2014.

2013

- Schuck, PC; Assis, DR; Viegas, CM; Pereira, TCB; Machado, JL; Furlanetto, CB; Bogó, MR; Streck, EL ; Ferreira, GC. "Ethylmalonic acid modulates Na⁺, K⁺-ATPase activity and mRNA levels in rat cerebral cortex". *Synapse*, v. 67, p. 111-117, 2013.
- Dal Forno, GO ; Kist, LW; de Azevedo, MB; Fritsch, RS; Pereira, TCB; Britto, RS; Guterres, SS; Kulkamp-Guerreiro, IC; Bonan, CD; Monserrat, JM; Bogó, MR. "Exposure to Nano/Microparticles of Fullerene Increases Acetylcholinesterase Activity and Lipid Peroxidation in Adult Zebrafish (*Danio rerio*) Brain." *BioMed Research International*, v. 2013, p.1-11, 2013.
- Cruz, FF ; Leite, CE; Pereira, TCB; Bogó, MR; Bonan, CD; Battastini, AMO; Campos, MM; Morrone, FB. "Assessment of mercury chloride-induced toxicity and the relevance of P2X7 receptor activation in zebrafish larvae." *Comparative Biochemistry and Physiology. C. Toxicology & Pharmacology*, v. 158, p. 159-164, 2013.
- Savio, LEB ; Vuaden, FC; Kist, LW ; Pereira, TCB; Rosemberg, DB; Bogó, MR; Bonan, C.D; Wyse, ATS. "Proline-induced changes in acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain: Reversal by antipsychotic drugs". *Neuroscience*, v. 250, p. 121-128, 2013.
- Leite, CE; Maboni, LO; Cruz, FF; Rosemberg, DB; Zimmermann, FF; Pereira, TCB; Bogó, MR; Bonan, CD; Campos, MM; Morrone, FB; Battastini, AMO. "Involvement of purinergic system in inflammation and toxicity induced by copper in zebrafish larvae". *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 272, p. 681-689, 2013.
- Conterato, GMM, Quatrin, A, Somacal, A, Ruviaro, AR, Vicentini, J, Augusti, PR, Sobieski, R, Figueiredo, C, dos Santos, CMM, Pereira, TCB, Bogó, MR, Flores, EMM, Emanuelli, T. "Acute Exposure to Low Lead Levels and its Implications on the activity and expression of cytosolic thioredoxin reductase in the kidney". *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2013.
- Ferreira, GK, Scaini, G, Jeremias, IC, Carvalho-Silva, M, Gonçalves, CL, Pereira, TCB, Oliveira, GMT, Kist, LW, Bogó, MR, SCHUCK, PF, Ferreira, GC, Streck, EL. "An Evaluation of the Effects of Acute and Chronic L-Tyrosine Administration on BDNF Levels and bdnf mRNA Expression in the Rat Brain." *Molecular Neurobiology*. (In Press), 2013.
- Leite, CE, Maboni, LO, Cruz, FF, Rosemberg, DB, Zimmermann, FF, Pereira, TCB, Bogó, MR, Bonan, CD, Campos, MM, Morrone, FB, Battastini, AMO. "Involvement of purinergic system in inflammation and toxicity induced by copper in zebrafish larvae." *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.272, p.681 - 689, 2013.
- Savio, LEB, Vuaden, FC, Kist, LW, Pereira, TCB, Rosemberg, DB, Bogó, MR, Bonan, CD, Wyse, ATS. "Proline-induced changes in acetylcholinesterase activity and gene

expression in zebrafish brain: Reversal by antipsychotic drugs." *Neuroscience*, v.250, p.121 - 128, 2013.

- Cruz, FF, Leite, CE, Pereira, TCB, Bogo, MR, Bonan, CD, Battastini, AMO, Campos, MM, Morrone, FB. "Assessment of mercury chloride-induced toxicity and the relevance of P2X7 receptor activation in zebrafish larvae." *Comparative Biochemistry and Physiology. C. Toxicology & Pharmacology*. v.158, p.159 - 164, 2013.
- Dal Forno, GO, Kist, LW, De Azevedo, M, Fritsch, R, Pereira, TCBP, Britto, RS, Guterres, SS, Kulkamp-guerreiro, IC, Bonan, CD, Monserrat, JM, Bogo, MR. "Intraperitoneal Exposure to Nano/Microparticles of Fullerene (C₆₀) Increases Acetylcholinesterase Activity and Lipid Peroxidation in Adult Zebrafish (Danio rerio) Brain." *BioMed Research International*. v.2013, p.1 - 11, 2013.
- Scaini, G, Mellos-Santos, L, Furlanetto, C, Jeremias, IC, Mina, F, Schuck, P, Ferreira, GC, Kist, LW, Pereira, TCB, Bogo, MR, Streck, EL. "Acute and Chronic Administration of the Branched-Chain Amino Acids Decreases Nerve Growth Factor in Rat Hippocampus." *Molecular Neurobiology (In Press)*, 2013.
- da Rocha, AM, Ferreira, JR, Barros, DM, Pereira, TCB; Bogo, MR, Oliveira, S, Geraldo, V, Lacerda, RG, Ferlauto, AS; Ladeira, LO, Pinheiro, MVB, Monserrat, JM. "Gene expression and biochemical responses in brain of zebrafish *Danio rerio* exposed to organic nanomaterials: Carbon nanotubes (SWCNT) and fullereneol (C₆₀(OH)₁₈₋₂₂(OK₄))." *Comparative Biochemistry and Physiology: Part A - Molecular & Integrative Physiology*. v.165, p.460-467, 2013.
- Longaray-Garcia, M, Flores, JA, Kulkamp-Guerreiro, IC, Guterres, SS, Pereira, TCB, Bogo, MR, Monserrat, JM. "Modulation of antioxidant and detoxifying capacity in fish *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) after treatment with nanocapsules containing lipoic acid." *Comparative Biochemistry and Physiology: Part A - Molecular & Integrative Physiology* v.165, p.468-475, 2013.

2012

- Sgnaolin, V, Pereira, TCB, Bogo, MR, Zanin, R, Battastini, AMO, Morrone, FB, Campos, MM. "Functional and molecular characterization of kinin B1 and B2 receptors in human bladder cancer: implication of the PI3K pathway." *Investigational New Drugs (In Press)*, 2012.
- Schuck, PCF, Assis, DR, Viegas, C, Pereira, TCB, Machado, JL, Furlanetto, CB, Bogo, MR, Streck, EL, Ferreira, G C. "Ethylmalonic acid modulates Na⁺, K⁺-ATPase activity and mRNA levels in rat cerebral cortex." *Synapse (In Press)*, 2012.
- Gehring, MP, Pereira, TCB, Zanin, RF, Borges, MC, Filho, AB, Battastini, AMO, Bogo, MR, Lenz, G, Campos, MM, Morrone, FB. "P2X7 receptor activation leads to increased cell death in a radiosensitive human glioma cell line." *Purinergic Signalling*, v.8, p. 729-739, 2012.
- Pereira, VN, Bortolotto, JW, Azevedo, MB, Fritsch, RS, Oliveira, RL, Pereira, TCB, Kist, LW, Vianna, MR, Bonan, CD, Bogo, MR. "Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*)." *Neurotoxicology (Park Forest South)*, p.469 - 475, 2012.
- Scaini, G, Rochi, N, Jeremias, IC, Deroza, PF, Zugno, AI, Pereira, TCB; Oliveira, GMT, Kist, LW, Bogo, MR, Schuck, PF, Ferreira, GC, Streck, EL. "Evaluation of Acetylcholinesterase in an Animal Model of Maple Syrup Urine Disease." *Molecular Neurobiology*, v. 45, p. 279-286, 2012.
- Vuaden, FC, Savio, LEB, Piato, AL, Pereira, TCB, Vianna, MR., Bogo, MR, Bonan, CD, Wyse, ATS. "Long-Term Methionine Exposure Induces Memory Impairment on Inhibitory Avoidance Task and Alters Acetylcholinesterase Activity and Expression in Zebrafish (*Danio rerio*)." *Neurochemical Research*, v.37, p.1545 - 1553, 2012.
- Ferreira, GK, Carvalho-Silva, M, Gonçalves, CI, Vieira, JS, Scaini, G, Ghedim, FV, Deroza, PF., Zugno, AI, Pereira, TCB, Oliveira, GMT, Kist, LW, Bogo, MR, Schuck, PF,

- Ferreira, GC, Streck, EI. "l-Tyrosine administration increases acetylcholinesterase activity in rats." *Neurochemistry International*, v.61, p.1370 - 1374, 2012.
- Kist, LW, Rosemberg, DB, Pereira, TCB, de Azevedo, MB, Richetti, SK, de Castro Leão, J, Yunes, JS, Bonan, CD, Bogo, MR. "Microcystin-LR acute exposure increases AChE activity via transcriptional ache activation in zebrafish (*Danio rerio*) brain." *Comparative Biochemistry and Physiology: Part C - Toxicology & Pharmacology*, 2012.