

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

VANESSA MAYNART PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO NA NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA
COMO RESPOSTA AOS EFEITOS CAUSADOS PELA EXPOSIÇÃO AO
AGROTÓXICO ENDOSULFAN UTILIZANDO ZEBRAFISH (*Danio rerio*) COMO
ORGANISMO MODELO**

Porto Alegre, RS
2012

VANESSA MAYNART PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO NA NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA
COMO RESPOSTA AOS EFEITOS CAUSADOS PELA EXPOSIÇÃO AO
AGROTÓXICO ENDOSULFAN UTILIZANDO *ZEBRAFISH* (*Danio rerio*) COMO
ORGANISMO MODELO**

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

Orientador: Prof. Dr. Maurício Reis Bogo

Porto Alegre, RS
2012

VANESSA MAYNART PEREIRA

**AVALIAÇÃO DA MODULAÇÃO NA NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA
COMO RESPOSTA AOS EFEITOS CAUSADOS PELA EXPOSIÇÃO AO
AGROTÓXICO ENDOSULFAN UTILIZANDO *ZEBRAFISH* (*Danio rerio*) COMO
ORGANISMO MODELO**

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

Aprovada em: ____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Maria Martha Campos - PUCRS

Dr. Emilio Streck - UNESC

Dra. Daniela Barros - FURG

Porto Alegre
2012

Ao meus pais pelo amor, confiança e suporte incondicionais, ao Renato, que é o irmão que todos deveriam ter e aos amigos pelo apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à PUCRS pela acolhida e infraestrutura.

Agradeço aos meus pais pelo patrocínio.

Agradeço ao Professor Maurício Bogo pela oportunidade, confiança, conhecimentos transmitidos, orientação, paciência, responsabilidade, incentivo, disponibilidade e exemplo de liderança.

Agradeço às professoras Carla Denise Bonan e Monica Ryff Vianna por suas contribuições no artigo.

Agradeço às colegas Mariana Barbieri de Azevedo, Rachel Seemann Fritsch, Luiza Wilges Kist, Renata da Luz Oliveira, Josiane Woutheres Bortolotto e Talita Carneiro Brandão Pereira que se dedicaram para auxiliar na execução deste projeto.

RESUMO

Endosulfan é um pesticida organoclorado de amplo espectro ainda utilizado largamente em muitos países subdesenvolvidos. As aplicações repetidas de endosulfan podem se incorporar aos cursos de água por meio da lixiviação dos solos das plantações e atingir animais aquáticos, incluindo espécies de peixes. Dado que a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) é um dos biomarcadores de exposição aos pesticidas mais utilizados de forma recorrente e há resultados controversos envolvendo os efeitos da exposição ao endosulfan e a atividade da AChE em peixes, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do endosulfan na atividade da AChE cerebral e seu padrão de expressão gênica utilizando *zebrafish* adulto (*Danio rerio*) como modelo experimental. Além disso, nós analisamos os efeitos da exposição ao endosulfan em diferentes parâmetros de locomoção do *zebrafish* e na formação da memória de longo prazo. Após 96h de exposição, os peixes do tempo com 2,4 µg/L de endosulfan apresentaram um decréscimo significativo na atividade da AChE ($9.44 \pm 1.038 \mu\text{mol SCh}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$; $p = 0.0205$) quando comparados com o grupo controle ($15.87 \pm 1.768 \mu\text{mol SCh}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg proteína}^{-1}$; $p = 0.0205$). A regulação inibitória da atividade da AChE cerebral não está diretamente relacionada com o controle transcricional como demonstrado pela análise de RT-qPCR. Nossos resultados reforçam a inibição da atividade da AChE como via da toxicidade induzida pelo endosulfan em cérebro de peixe. Além disso, a exposição de 2,4 µg/L do endosulfan durante 96h prejudicou todos os parâmetros exploratórios avaliados: linhas cruzadas (273.7 ± 28.12 número de linhas cruzadas em comparação com o grupo controle: 344.6 ± 21.30 , $p=0.0483$), distância viajada (23.44 ± 2.127 metros comparados com o grupo controle 29.39 ± 1.585 , $p=0.0281$), velocidade média (0.03 ± 0.003 metros/segundos comparados com o grupo controle 0.04 ± 0.002 , $p=0.0275$) e mudanças de ângulo ($69,940 \pm 4,871$ mudanças de ângulo absolutas comparadas com o grupo controle $88,010 \pm 4,560$ $p=0.0114$). Esses resultados sugerem que a exposição ao endosulfan prejudica significativamente a performance exploratória dos animais e, potencialmente, compromete suas interações interespecíficas e ecológicas. Nossos resultados também demonstraram que a mesma exposição ao endosulfan não compromete a performance dos animais no aparato de esquiva inibitória. Esses

achados fornecem evidências adicionais de efeitos deletérios da exposição ao endosulfan no sistema nervoso.

Palavras-chave: Organoclorados. Endosulfan. Neurotoxicidade. Acetilcolinesterase. Comportamento alterado. Zebrafish.

ABSTRACT

Endosulfan is a broad spectrum organochlorine pesticide that is still widely used in many developing countries. Following application endosulfan can get to watercourses through surface runoff from agricultural fields and disturb the non-target aquatic animals including freshwater fish species. Given that the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) is one of the most recurrently used biomarkers of exposure to pesticides and there are controversial results concerning the effects of endosulfan exposure and AChE activity in fish, the aim of the present study was to evaluate the effects of endosulfan in brain AChE activity and its gene expression pattern using adult zebrafish (*Danio rerio*) as an animal model. Moreover, we have analyzed the effects of endosulfan exposure in different parameters of zebrafish swimming activity and in long-term memory formation. After 96 hours of exposition, fish in the 2.4 µg endosulfan/L group presented a significant decrease in AChE activity ($9.44 \pm 1.038 \mu\text{mol SCh}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$; $p = 0.0205$) when compared to the control group ($15.87 \pm 1.768 \mu\text{mol SCh}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$; $p = 0.0205$). The down-regulation of brain AChE activity is not directly related with the transcriptional control as demonstrated by the RT-qPCR analysis. Our results reinforce AChE activity inhibition as a pathway of endosulfan-induced toxicity in brain of fish species. In addition, exposure to 2.4 µg endosulfan/L during 96 hours impaired all exploratory parameters evaluated: decreased line crossings (273.7 ± 28.12 number of line crossings compared to the control group 344.6 ± 21.30 , $p=0.0483$), traveled distance (23.44 ± 2.127 meters compared to the control group 29.39 ± 1.585 , $p=0.0281$), mean speed (0.03 ± 0.003 meters/seconds compared to the control group 0.04 ± 0.002 , $p=0.0275$) and body turn angle ($69,940 \pm 4,871$ absolute turn angle compared to the control group $88,010 \pm 4,560$ $p=0.0114$). These results suggest that endosulfan exposure significantly impairs animals' exploratory performance, and potentially compromises their ecological and interspecific interaction. Our results also showed that the same endosulfan exposure did not compromise animals' performance in the inhibitory avoidance apparatus. These findings provide further evidence of the deleterious effects of endosulfan exposure in the nervous system.

Keywords: Organochlorines. Endosulfan. Neurotoxicity. Acetylcholinesterase. Altered-behavior. Zebrafish.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Endosulfan e suas formulações químicas. A (α endosulfan), B (β endosulfan) e C (endosulfan sulfato).....16

LISTA DE SIGLAS

Ach – Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

Acetil Coa – Acetil Coenzima A

BuChE – Butirilcolinesterase

ChAT – Colinaacetiltransferase

DNA – Ácido desoxirribonucleico

GABA – Ácido γ -aminobutírico

mRNA – RNA mensageiro

SACHÉ – Acetilcolinesterase sérica

SNC – Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	9
LISTA DE SIGLAS	10
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	12
1.1 INTRODUÇÃO	12
1.1.1 <i>Zebrafish</i>	12
1.1.2 Neurotransmissão Colinérgica	13
1.1.3 Endosulfan	15
1.1.3.1 Endosulfan e Acetilcolinesterase	18
1.1.3.2 Endosulfan e Comportamento	19
1.1.3.3 Endosulfan e <i>Zebrafish</i>	21
1.2 OBJETIVOS	22
1.2.1 Objetivo Geral	22
1.2.2 Objetivos Específicos	22
CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO	23
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 *Zebrafish*

O *zebrafish* ou peixe-zebra é um pequeno teleósteo de água doce que mede em torno de 3 à 4 cm (Sloman et al., 2003; Best e Alderton, 2008). Pertence à família *Cyprinidae* e suas espécies estão distribuídas por todo o sul e sudeste da Ásia (Spence et al., 2008). Ele é reconhecido como modelo experimental em diversas áreas da Biologia nos dias atuais (Zon e Peterson, 2005; Spence et al., 2008; Chakraborty et al., 2009; Belyaeva, et al. 2009; Pereira et al., 2011).

As vantagens de utilizá-lo consistem no fato de que seu reduzido tamanho contribui para a logística de armazenamento, as condições de alimentação e manutenção são bem determinadas (Hill et al., 2005; Park et al., 2008), possui baixo custo, requer pouco espaço para manutenção, possui um rápido desenvolvimento e ciclo biológico, fácil manipulação e seu comportamento pode ser facilmente observado e quantificado em um ambiente controlado (Sloman et al., 2003) e, ainda, possui sensibilidade a drogas e rápido metabolismo (Karlovich et al., 1998; Goldsmith, 2004).

Atualmente, a utilização do *zebrafish* vem sendo expandida para outras áreas do conhecimento, tais como bioquímica (Taylor et al., 2004), nanotecnologia (Lukianova et al., 2010), neurociências (Edwards e Michel, 2002), toxicologia (Hill et al., 2005), hematologia (Ellett e Lieschke, 2010), farmacologia (Goldsmith et al., 2004), teratologia (Busch et al., 2011) e biologia do comportamento (Gerlai, 2003; Guo, 2004). Além disso, o *zebrafish* tem sido bastante utilizado para estudos sobre doenças humanas (Rubinstein et al., 2003) e na área do desenvolvimento devido não só à transparência do embrião e à manifestação de aspectos-chaves da morfogênese de órgãos e maturação (Lieschke e Currie, 2007; Peterson et al., 2008; Liang et al., 2009; Yen et al., 2011), mas também por sua fecundidade, genética e similaridades fisiológica e morfológica com os mamíferos (Zhang et al., 2009; DeMicco et al., 2010). Essas características contribuem, inclusive, para que sejam realizados estudos para descoberta de drogas (Crawford et al., 2008; Chakraborty et al., 2009). Os genes deste teleósteo são conservados evolutivamente e apresentam

um alto grau de similaridade com os genes humanos e de camundongos (Barbazuk et al., 2000; Lieschke e Currie, 2007).

Recentemente, o *zebrafish* vem sendo utilizado em pesquisas relacionadas com efeitos teratogênicos causados por agrotóxicos (Gui et al., 2011) e em estudos neurotoxicológicos do desenvolvimento (Jacobson et al., 2010; Dou et al., 2011; Yen et al., 2011). O uso do *zebrafish* como modelo experimental é visto como um meio rápido e com custo-benefício favorável para avaliar os efeitos causados pela exposição aos pesticidas sobre o sistema nervoso (Zhou et al., 2009; DeMicco et al., 2010).

Nos últimos dez anos, o *zebrafish* tem sido utilizado largamente para o monitoramento da toxicidade ambiental, efeito aditivo e toxicidade de substâncias tais como: metais pesados, agrotóxicos, compostos de hidrocarbonetos aromáticos halogenados e outros carcinógenos (Roex, 2003; Liang, 2009; Rocco, 2010; Ung, 2010).

1.1.2 Neurotransmissão Colinérgica

Nas décadas de 1920 e 1930, alguns pesquisadores como Otto Loewi, Sir Henry Dale, Sir William Feldberg demonstraram a presença da transmissão colinérgica e da acetilcolinesterase (AChE) nos sistemas nervoso autônomo simpático e parassimpático, além da junção neuromuscular (Karczmar et al., 2010). A neurotransmissão colinérgica é fundamental para o funcionamento correto do SNC, e representa o sistema neurotransmissor mais antigo filogeneticamente (Gotti and Clementi, 2004).

A acetilcolina (ACh) é o neurotransmissor mais importante do sistema colinérgico, o qual está envolvido em respostas comportamentais específicas, processos cognitivos e controle da atividade locomotora (García-Ayllón et al., 2008; Martins-Silva et al., 2011). A acetilcolina desempenha um papel fundamental no SNC e está relacionada ao comportamento, aprendizado, memória, consciência, atenção, organização cortical do movimento e controle do fluxo sanguíneo e oxigenação cerebrais (Mesulam et al., 2002; Moretto et al., 2004; Hoff et al., 2010; Van der Zee et al., 2011; van Waarde et al., 2011). Além de sua ação neurotransmissora, a ACh possui função neuromoduladora, pois os níveis da mesma

podem regular a concentração de outros neurotransmissores no cérebro (Cooper et al., 1991).

Na transmissão colinérgica, a acetilcolina é sintetizada no neurônio pré-sináptico a partir de colina e acetil coenzima A (Acetil CoA), principalmente, pela ação da colina-acetiltransferase (ChAT), que regula seus níveis constantemente, sugerindo-se, desta maneira, que ela seja produzida e liberada sem ficar estocada (Behra et al., 2002; Kawashima e Fujii, 2008). A colina utilizada na síntese de ACh pode vir diretamente da reciclagem da mesma, que é hidrolisada pela AChE na fenda sináptica ou a partir da fosfatidilcolina (Taylor and Brown, 1994).

A liberação de ACh depende das variações no potencial elétrico das membranas dos terminais nervosos e este processo é dependente da concentração de cálcio intracelular. Ao ser liberada na fenda sináptica, a ACh interage com receptores específicos causando despolarização e propagação do potencial de ação na célula pós-sináptica (Oda, 1999), ligando-se aos receptores muscarínicos (metabotrópicos) e os nicotínicos (ionotrópicos) (Wessler e Kirkpatrick et al., 2008; Siebel et al., 2010; Harrington 2010).

Após a liberação, a acetilcolina é removida pela acetilcolinesterase, que pertence à família das carboxiesterases do tipo B, da fenda sináptica, clivando-a em colina e acetato. A enzima AChE é expressa em vários tecidos, incluindo o muscular, bem como o SNC (Behra et al., 2002). Nos vertebrados, a acetilcolina atua como neurotransmissor excitatório no sistema nervoso autônomo, sendo fundamental para a função muscular (Ballesteros et al., 2009; Jospin et al., 2009)

Dois tipos de colinesterases hidrolisam a acetilcolina: acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase (BuChE) (Downes e Granato, 2004; Seibt et al., 2009; Adler et al., 2011). Embora tenha sido demonstrado que no *zebrafish* não se observam genes que codificam a BuChE, já foi relatada a presença de um gene que codifica a AChE (Bertrand et al., 2001; Rico et al., 2007).

Embora a organização geral do sistema colinérgico no SNC seja similar entre vertebrados, observa-se uma maior variabilidade em peixes uma vez que não são observadas duas regiões (habênula e formação reticular rombencefálica) que apresentam a enzima ChAT nos neurônios colinérgicos do *zebrafish*, o que ocorre na maioria das espécies de vertebrados analisadas (Clemente et al., 2005).

1.1.3 Endosulfan

Agrotóxicos são produtos químicos que se tornaram indispensáveis para combater pragas. Também podem receber a denominação de praguicidas, pesticidas, defensivos agrícolas, agroquímicos ou biocidas. Eles possuem diversas subcategorias, tais como: inseticidas, fungicidas, herbicidas e rodenticidas (Gilden et al., 2010; Chopra et al., 2011). São utilizados na agricultura devido aos benefícios econômicos que proporcionam uma vez que ocasionam o aumento da safra e a proteção da qualidade, confiabilidade e preço da produção. Contudo, podem resultar em efeitos negativos para o ambiente e a todos que nele estão inseridos (Fernandez-Alvarez et al., 2010).

Os pesticidas são divididos em três classes principais: organofosforados, carbamatos e organoclorados, que são os pesticidas mais comumente encontrados no ambiente incluindo água, sedimentos, ar atmosférico e biota (Chopra et al., 2011). Os agrotóxicos da classe dos organoclorados são poluentes semi-voláteis e, por serem substâncias persistentes, bioacumuláveis e tóxicas, representam um risco para o ambiente, pois causam um impacto significativo numa grande variedade de espécies e em todos os níveis tróficos uma vez que possuem resistência química, fotoquímica e biológica à degradação, além de serem lipofílicos (Daglioglu et al., 2010; Cooney et al., 2010; Gómez et al., 2011; Okay, 2011). Os organoclorados são moléculas muito estáveis e, devido a isso, apresentam resistência em relação ao meio ambiente e possuem propriedade de difusão nos tecidos gordurosos. Além disso, seu tempo de meia-vida é maior do que dez anos (Fernández-Bringas et al., 2008). Portanto, eles podem elevar sua concentração ao longo da cadeia alimentar e produzir um aumento significativo em relação à inicial quando no topo da mesma (Dhananjayan et al., 2010; Oyekunle et al., 2011).

Os organoclorados podem contaminar o ambiente aquático através de correntezas vindas por meio de fontes não-identificadas, descarga tanto do esgoto comum, bem como do industrial e, por deposição, podendo se acumular nos sedimentos. Deste modo, são ressuspensos, fazendo com que os contaminantes possam entrar novamente no ambiente marinho e circular no ecossistema, resultando numa segunda contaminação (Okay et al., 2011).

Devido ao fato de se observar uma grande variação de efeitos agudos e crônicos derivados da exposição aos organoclorados tais como: câncer, danos

neurológicos, defeitos congênitos e alterações endócrinas, eles estão sendo banidos em diversos países (Ly et al., 2010)

Os organoclorados são constituídos, essencialmente, por carbono, hidrogênio e cloro, incluindo, entre outros, bifenilas policloradas (PCBs), dibenzo-p-furanos policlorados (PCDFs), diclorodifeniltricloroetano (DDT), dieldrin, clordano, heptacloro, toxapeno, mirex, lidano, dicofol, hexaclorobenzeno, clorodecano e endosulfan (Van Dyk and Pletschke, 2011).

Endosulfan é um inseticida e acaricida utilizado em diversos tipos de culturas, entre elas: vegetais, tabaco, algodão, frutas e nozes. É um composto químico que contém uma mistura de dois isômeros biologicamente ativos (70% alfa e 30% beta endosulfan). O principal metabólito ambiental encontrado na água, sedimentos e tecidos é o endosulfan sulfato resultante de um processo de oxidação (Rand et al., 2010; Li et al., 2011) (Figura 1). Suas frações alfa e beta possuem meia-vida de 24 horas quando estão em contato com a água. Ao ocorrer a degradação após este período, esses isômeros se apresentam sob a forma de endosulfan sulfato, sendo mais persistente na água com meia-vida de cinco a sete dias dependendo das condições de temperatura e pH do ambiente (Fracácio et al., 2008).

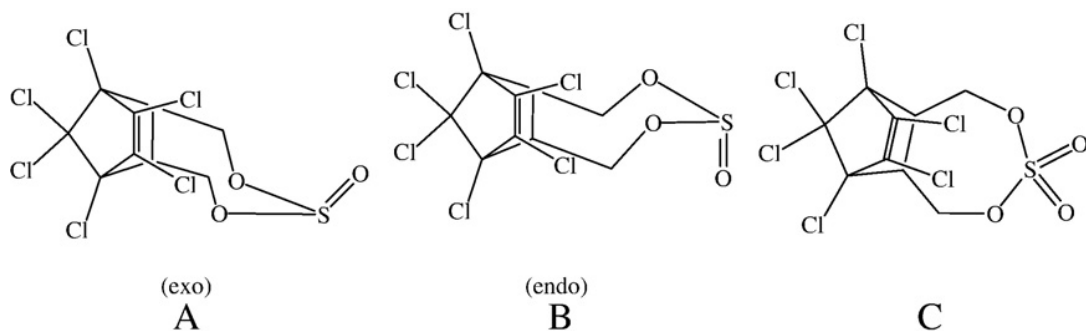


Figura 1 – Endosulfan e suas formulações químicas. A (α endosulfan), B (β endosulfan) e C (endosulfan sulfato). Retirado de Weber et. al. (2010)

Este agrotóxico é utilizado de forma generalizada desde 1954 em muitas partes do mundo tais como: União Européia, Índia, Indonésia, Austrália, Canadá, Estados Unidos, América Central, México, Brasil e China. Seus nomes comerciais incluem: Thiodan[®], Endox[®], Thiomul[®], Beosit[®], Endocell[®], Malix[®], Thionex[®], Insecto[®] e Tiovel[®] (Weber et al., 2010).

Este pesticida é extremamente tóxico para peixes (Tellez-Bañuelos et al., 2010). Segundo Da Cuña et al. (2011), a LC50 para teleósteos é observada numa exposição de 96h sob 2,6 µg/L de endosulfan. No momento da mistura do endosulfan com a água, ocorre a incorporação pela ingestão, contato direto com a pele, escamas e mucosas, podendo ser o responsável pelo envenenamento direto dos organismos aquáticos quando em altas doses. Este inseticida afeta o sistema endócrino de mamíferos e está associado ao dano de DNA, relacionando-se com genotoxicidade, mutagenicidade (Bajpayee et al., 2006), neurotoxicidade (Yavuz et al., 2007), estresse oxidativo em macrófagos (Tellez-Bañuelos et al., 2009), alterações histológicas nas brânquias e fígado (da Cuña et al., 2011) e declínio da secreção do cortisol e aumento na atividade da glutathione S-transferase (Ezemonye e Ikpesu, 2011). Além de causar hiperexcitação no SNC, ele inibe as Na⁺/K⁺ e Ca²⁺/Mg²⁺ ATPases, essenciais para o transporte iônico através das membranas de mamíferos bem como em peixes (Tellez-Bañuelos et al., 2009).

O principal neurotransmissor inibitório do SNC é o ácido γ-aminobutírico (GABA) e, em condições normais, atua sobre seus receptores induzindo o influxo de íons cloreto nos neurônios através de um gradiente eletroquímico, causando uma hiperpolarização na membrana e um efeito inibitório na célula (Pomés et al., 1994).

A ação antagonista não-competitiva do endosulfan nos receptores ionotrópicos do GABA provoca a redução da captação dos íons de cloro. Uma vez bloqueada a entrada de íons pelo endosulfan, ocorre a repolarização parcial do neurônio, ocasionando um estado descontrolado de excitação (Vale et al., 2003; Nota técnica ANVISA, 2009).

O endosulfan é considerado um importante agente de toxicidade aguda, sendo que as manifestações mais comuns são as neurológicas, embora possam ocorrer outras disfunções orgânicas (Moses and Peter, 2010). Os sinais relacionados à neurotoxicidade são: hiperatividade, tremores, ataxia, tontura, desequilíbrio, comprometimento da memória, diminuição da respiração, dispneia, salivação, náusea vômitos, diarreia, parestesia, vertigem, falência respiratória e cardíaca, convulsões com possibilidade de epilepsia e coma (Nota técnica ANVISA, 2009).

1.1.3.1 Endosulfan e Acetilcolinesterase

Há estudos envolvendo o efeito do endosulfan sobre a modulação da atividade da AChE com interação de outros compostos e os resultados indicam a hipótese de sua inibição em animais que não sejam adultos. Por exemplo, Mor e Ozmen (2010) verificaram inibição da AChE cerebral em um estudo realizado com coelhos de oito meses de idade expostos ao pesticida. Ainda, houve efeito protetor da vitamina C. Os animais foram divididos em quatro categorias de acordo com as substâncias administradas: grupo 1 (endosulfan 1mg/kg), grupo 2 (endosulfan e vitamina C 20 mg/kg), grupo 3 (óleo e vitamina C) e grupo 4 (óleo). Observou-se um decréscimo na atividade da acetilcolinesterase sérica (SACHÉ) em ambos os grupos de animais tratados com endosulfan durante seis semanas. Contudo, o declínio mais acentuado ocorreu no grupo exposto apenas ao agrotóxico. Foi demonstrado que a vitamina C preveniu a perda de atividade da SACHÉ no grupo 2. Kumar et al.(2011) avaliaram a atividade da AChE cerebral do peixe *Labeo rohita* jovem após uma exposição ao endosulfan durante 37 dias com suplementação da dieta de colina, betaína e lecitina juntamente com uma concentração de 1/10 da LC50 do endosulfan, havendo diminuição da atividade da AChE entre o grupo controle e o exposto ao endosulfan, mas que não receberam suplemento na dieta.

Em relação ao meio aquático, o estudo de Trekels et al.(2011) foi conduzido a fim de avaliar o risco de predação e a atividade de quatro biomarcadores enzimáticos, entre eles a AChE através da exposição ao endosulfan de quatro espécies de insetos da família *Corixidae* (*Cymatia coleoprata*, *Hesperocorixa linnaei*, *Sigara lateralis* e *Sigara striata*). Observou-se que a atividade da AChE cerebral foi inibida na concentração de 2 µg/L durante sete dias e não houve diferença significativa entre as espécies. O risco de predação sofreu, igualmente, uma inibição na espécie *S. striata*.

Os achados nos estudos acerca da influência do endosulfan na modulação da AChE em peixes são controversos. Alguns trabalhos não evidenciam efeitos produzidos pela ação do endosulfan na modulação da AChE cerebral. Da Cuña et. al. (2011) não verificaram alterações na atividade da AChE em *Cichlasoma dimerus* adultos quando expostos a 24, 48, 72 e 96 h em concentrações que variaram de 0,25 até 16 µg/L. Em um estudo de Ezemonye e Ikpesu (2010), não foi observada

mudança na atividade da AChE sérica quando *Clarias gariepinus* jovem foram expostos por um período de 7, 14, 21 e 28 dias em concentrações de até 0,01 µg/L.

Ballesteros et. al. (2009) descreveram uma diminuição na atividade dessa enzima no músculo de *Jenynsia multidentata* adulto de aproximadamente 37-43%; porém, não foi observada nenhuma mudança ao nível cerebral em nenhuma das concentrações testadas. Os peixes foram submetidos a cinco doses subletais (0,072; 0,144; 0,288; 0,7 e 1,4 µg/L) durante 24 h de exposição aguda *in vivo*. Por outro lado, a inibição da AChE cerebral em peixes foi verificada por Dutta e colaboradores (2003), utilizando o peixe jovem *Lepomis macrochirus* como modelo de estudo. Utilizou-se no experimento *in vivo* a dose de 1 µg/L durante 24, 48, 72, 96 h e uma semana de exposição crônica, sendo foi observadas inibições em 3,57%; 12,65%; 14,23%; 16,31% e 23,11% respectivamente.

1.1.3.2 Endosulfan e Comportamento

De acordo com os dados da literatura, até o momento, a influência do endosulfan nos parâmetros de locomoção nas mais variadas espécies é também controversa. Em relação aos estudos com vertebrados em geral, Brunelli et al.(2009) verificaram a alteração no comportamento das larvas do sapo *Bufo bufo* em uma exposição crônica ao endosulfan, utilizando as concentrações de 0,01 mg/L, 0,05 mg/L e 0,1 mg/L durante o período de 43 até 52 dias. Foram observados diversos efeitos, entre eles: locomoção defeituosa, atraso no desenvolvimento, aumento da incidência de má-formação na boca e no esqueleto, além do tempo prolongado na metamorfose.

No que se refere ao meio aquático, Ferrando et al.(1991) realizou um ensaio com enguias (*Anguilla anguilla*), onde os animais foram expostos a alguns pesticidas, entre eles o endosulfan, o qual configurou-se o mais tóxico, nos tempos de 24, 48, 72 e 96 h. A LC50 variou entre 0,042 mg/L e 0,041 mg/L. Verificou-se motilidade errática e inquieta, convulsões e dificuldade na respiração.

No estudo de Gutierrez et al.(2011), foi lançada a hipótese de que a exposição do zooplâncton ao endosulfan e ao cromo causaria redução na motilidade e desorientação. O experimento foi realizado com tubos transparentes de 150 cm, onde foram observados os movimentos ascendentes e descendentes realizados

pelas espécies *Argyrodiaptomus falcifer*, *Notodiptomus conifer*, *Pseudosida variabilis*, *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia magna* durante períodos de 24h.

Poucos estudos analisam a possível relação entre a exposição ao endosulfan e mudanças comportamentais acerca da locomoção em peixes. Giusi et al.(2005), expuseram o peixe *Thalassoma pavo* jovem ao endosulfan e ao cádmio. A concentração do pesticida foi de 0,2 µg/L por uma semana. Foram observados movimentos hiperativos tais como: locomoção na vertical e o choque com outros peixes ou contra o aquário, mas de uma forma menos significativa. Além disso, notou-se redução da alimentação. Ballesteros et al.(2009), utilizaram o peixe adulto *Jenynsia multidentata* como modelo e realizaram uma exposição de 48 h das fêmeas ao endosulfan. Verificou-se redução na motilidade após 45h na concentração de 0,072 µg/L e, após 24h, em 1,4 µg/L.

Em relação aos trabalhos avaliando a memória após exposição dos animais ao endosulfan, alguns estudos foram conduzidos com ratos. Os achados sugerem que este agrotóxico possivelmente induz déficit de memória no modelo experimental utilizado. Lakshmana et al.(1994) expuseram ratos a 6 mg/kg de endosulfan desde o segundo até o 25º dia após o nascimento. Foi medida a atividade da AChE em várias regiões do cérebro dos animais e não houve alteração significativa. Em relação à memória, foram observados déficits quando à aquisição e retenção. Porém, é necessário considerar os relatos em que não houve alteração na motilidade dos animais, mas em sua memória. Paul et al. (1994), submetem ratos jovens a 2 mg/kg/dia durante 90 dias. A coordenação motora dos animais não foi afetada, a atividade da AChE cerebral não foi alterada; contudo, foi sugerido que o endosulfan produz déficit de memória. Paul et al.(1992), realizaram um estudo com ratos onde não houve alteração na atividade locomotora; porém, a memória foi inibida após uma exposição crônica ao endosulfan.

De acordo com Paul et al.(1995), o tratamento com administração oral de endosulfan em ratos adultos, num período de 30 dias (3 e 6mg/kg por dia) possibilitou que fosse observado comprometimento nos processos de memória tanto de machos como de fêmeas. Não houve mudança na atividade da AChE. Além disso, o endosulfan não estimulou mudanças na atividade motora. Até o momento, não há relatos de estudos envolvendo memória em peixes quando submetidos ao endosulfan.

Desta maneira, pode-se observar que as doses que induziram ao déficit de memória foram similares entre os estudos e que o tempo de exposição ao pesticida foi prolongado (mínimo de 23 dias). Além disso, a idade do animal não foi determinante para que ocorresse essa alteração uma vez que ela aconteceu com animais adultos e jovens.

1.1.3.3 Endosulfan e *Zebrafish*

Poucos estudos avaliaram os efeitos da exposição ao endosulfan durante o desenvolvimento de *zebrafish*. No único estudo encontrado com animais adultos em relação ao endosulfan, Velasco-Santamaría et al.(2011) submeteram *zebrafish* a duas concentrações deste pesticida (0,16 e 0,48 µg/L) por 28 dias. No 14º dia, os peixes expostos a 0,16 µg/L apresentaram redução significativa na contagem de glóbulos vermelhos do que os que receberam 0,48 µg/L, além disso, demonstraram uma elevação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) quando comparados com o grupo controle. Ambas as concentrações provocaram um aumento na atividade das Na(+)/K(+) ATPases. Neste dia, também, os animais expostos apresentaram aumento no diâmetro dos hepatócitos; porém, foi notada uma redução do seu número quando comparado com o grupo controle. Os batimentos cardíacos mostraram-se reduzidos significativamente nas larvas em comparação com os adultos. Portanto, a exposição ao endosulfan causa efeitos adversos nos animais adultos e afeta o desenvolvimento da sua prole.

No entanto, há o relato de um estudo que utilizou apenas a fração β do endosulfan. Segundo Han et. al. (2011), a exposição de *zebrafish* adultos a essa fração afetou as funções reprodutivas e a produção de vitelogenina pelo fígado em machos. Este trabalho ainda reforçou a característica de provocar disfunções endócrinas deste agrotóxico.

Foi realizado um estudo por Stanley et. al. (2009) utilizando *zebrafish* como modelo experimental. Os peixes foram expostos ao endosulfan I (99,5%) na dose de 0,01 até 10 µg/L e ao endosulfan sulfato (98,9%) na dose de 1 – 100 µg/L durante o período de 6 até 120 h pós-fertilização. Foram realizadas análises químicas na água, no embrião e em amostras de larvas para determinar as concentrações contidas na água e nos tecidos por todo o período de cinco dias.

Os dados obtidos sugeriram que o endosulfan I e o endosulfan sulfato foram neurotóxicos para o desenvolvimento. Observaram-se anormalidades comportamentais associadas com neurotoxicidade, resultando em convulsões, alterações na motilidade e paralisia. Willey et. al. (2001) expuseram embriões prematuros de *zebrafish* ao endosulfan (99,8%) em um período de 2 - 2,5 h pós-fertilização. Por meio de hibridização *in situ*, observou-se que houve alteração da distribuição das células germinativas primordiais antes do desenvolvimento de uma gônada morfológicamente distinta.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar se parte da toxicidade induzida pela exposição ao endosulfan é consequência da modulação do sistema de neurotransmissão colinérgico, utilizando-se *zebrafish* como organismo.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do tratamento *in vitro* com endosulfan sobre a atividade da acetilcolinesterase em homogenato cerebral de *zebrafish*;
- Avaliar o efeito do tratamento *in vivo* com endosulfan sobre a atividade da acetilcolinesterase em homogenato cerebral de *zebrafish*;
- Verificar a expressão do gene que codifica para acetilcolinesterase após o tratamento *in vivo* com endosulfan;
- Avaliar o efeito da exposição ao endosulfan sobre a locomoção e memória em *zebrafish*.

CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO

Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*)

Vanessa Maynard Pereira, Josiane Woutheres Bortolotto, Luiza Wilges Kist, Mariana Barbieri de Azevedo, Rachel Seemann Fritsch, Renata da Luz Oliveira, Talita Carneiro Brandão Pereira, Carla Denise Bonan, Monica Ryff Vianna, and Maurício Reis Bogo

(Artigo aceito para publicação pela revista científica NeuroToxicology)



Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](#)

NeuroToxicology



Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*)

Vanessa Maynard Pereira^a, Josiane Woutheres Bortolotto^b, Luiza Wilges Kist^a,
Mariana Barbieri de Azevedo^a, Rachel Seemann Fritsch^a, Renata da Luz Oliveira^b,
Talita Carneiro Brandão Pereira^a, Carla Denise Bonan^{b,d}, Monica Ryff Vianna^{c,d}, Maurício Reis Bogo^{a,d,*}

^a Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 February 2012

Accepted 11 March 2012

Available online xxx

Keywords:

Organochlorines
Endosulfan
Neurotoxicity
Acetylcholinesterase
Altered-behavior
Zebrafish

ABSTRACT

Endosulfan is a broad spectrum organochlorine pesticide that is still widely in use in many developing countries. Following application, endosulfan can get to watercourses through surface runoff from agricultural fields and disturb the non-target aquatic animals including freshwater fish species. Given that the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) is one of the most recurrently used biomarkers of exposure to pesticides and there are controversial results concerning the effects of endosulfan exposure and AChE activity in fish, the aim of the present study was to evaluate the effects of endosulfan in brain AChE activity and its gene expression pattern using adult zebrafish (*Danio rerio*) as an animal model. Moreover, we have analyzed the effects of endosulfan exposure in different parameters of zebrafish swimming activity and in long-term memory formation. After 96 h of exposition, fish in the 2.4 µg endosulfan/L group presented a significant decrease in AChE activity ($9.44 \pm 1.038 \mu\text{mol SCh h}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$; $p = 0.0205$) when compared to the control group ($15.87 \pm 1.768 \mu\text{mol SCh h}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$; $p = 0.0205$) which corresponds to approximately 40%. The down-regulation of brain AChE activity is not directly related with the transcriptional control as demonstrated by the RT-qPCR analysis. Our results reinforce AChE activity inhibition as a pathway of endosulfan-induced toxicity in brain of fish species. In addition, exposure to 2.4 µg endosulfan/L during 96 h impaired all exploratory parameters evaluated: decreased line crossings ($\approx 21\%$, 273.7 ± 28.12 number of line crossings compared to the control group 344.6 ± 21.30 , $p = 0.0483$), traveled distance ($\approx 20\%$, 23.44 ± 2.127 m compared to the control group 29.39 ± 1.585 , $p = 0.0281$), mean speed ($\approx 25\%$, 0.03 ± 0.003 m/s compared to the control group 0.04 ± 0.002 , $p = 0.0275$) and body turn angle ($\approx 21\%$, $69,940 \pm 4871$ absolute turn angle compared to the control group $88,010 \pm 4560$, $p = 0.0114$). These results suggest that endosulfan exposure significantly impairs animals' exploratory performance, and potentially compromises their ecological and interspecific interaction. Our results also showed that the same endosulfan exposure did not compromise animals' performance in the inhibitory avoidance apparatus. These findings provide further evidence of the deleterious effects of endosulfan exposure in the nervous system.

© 2012 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Pesticides are chemicals that became indispensable in current agriculture to control pest populations. Three of the main classes of

pesticides are organochlorines, organophosphorous and carbamates. Organochlorines are the most commonly found pesticides in the environment including water, sediments, atmospheric air and biotic environment (Chopra et al., 2011). Organochlorine pesticides consist of a variety of chemicals composed primarily of carbon, hydrogen and chlorine that include among others polychlorinated biphenyls (PCBs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), dichlorodiphenyl-trichloroethane (DDT), dieldrin, chlordane, heptachlor, toxaphenes, mirex, lindane, dicofol, hexachlorobenzene, chlordecone and endosulfan (for review see Van Dyk and Pletschke, 2011).

* Corresponding author at: Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681 - 12C - sala 134, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3353 4726; fax: +55 51 3320 3568.

E-mail address: mbogo@puccrs.br (M.R. Bogo).

Endosulfan is a broad spectrum insecticide–acaricide of the cyclodiene subgroup which consists of two biologically active isomers: alpha and beta, respectively in a 7:3 ratio (Wan et al., 2005) whereas endosulfan sulfate is the main environmental metabolite found in water, sediments and tissues (Rand et al., 2010). Following application, endosulfan can get to watercourses through surface runoff from agricultural fields (Miglioranza et al., 2002) and reach the groundwater through percolation (Chopra et al., 2011). According to previous studies, the toxicity of endosulfan and endosulfan sulfate to non-target aquatic animals including freshwater fish species seems to be similar (Wan et al., 2005; Carriger et al., 2011; Da Cuña et al., 2011).

Although the molecular mechanisms of endosulfan's toxicity are still mostly unknown, some aspects have already been addressed. The adverse effects caused by exposure to endosulfan include DNA damage and mutagenicity (Bajpayee et al., 2006), genotoxicity (Neuparth et al., 2006), neurotoxicity (Yavuz et al., 2007), oxidative stress in macrophages (Tellez-Bañuelos et al., 2009), histological alterations in gills and liver (Da Cuña et al., 2011) and decline in cortisol secretion and increase in glutathione S-transferase activity (Ezemonye and Ikpesu, 2011).

In cholinergic neurotransmission, the neurotransmitter acetylcholine (ACh) promotes the activation of muscarinic and nicotinic cholinergic receptors. Acetylcholine is a neurotransmitter critically involved in psychomotor control of movement and an important modulator of cognitive functions such as learning and memory (Hasselmo, 2006). The reaction responsible for the maintenance of levels of ACh in the extracellular space is catalyzed by acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE), by the degradation of ACh into choline and acetate (Soreq and Seidman, 2001). The zebrafish (*Danio rerio*) is recognized as a consolidated experimental model for studying several biological events. More recently, zebrafish has also become an attractive model for environmental and toxicological studies (Hernández and Allende, 2008). It has been demonstrated that BuChE is not encoded in the zebrafish genome, but AChE is encoded by a single gene that has been functionally detected in zebrafish brain (Bertrand et al., 2001).

AChE activity has been extensively used as a bioindicator of environmental exposure. The inhibition of AChE as a biomarker for assessment of the exposure of organisms to organophosphate and carbamate pesticides is long well-known (for review see Van Dyk and Pletschke, 2011). The inhibition of AChE by organophosphates and carbamates occurs, respectively, as a result of the phosphorylation or carbamylation of the serine residue in the active site of the enzyme (Fukuto, 1990). Other toxic compounds than organophosphate and carbamate pesticides either promote AChE inhibition and AChE activation in fish. For instance, the inhibition of zebrafish brain AChE activity by methanol (Rico et al., 2006) and the heavy metals mercury and lead (Richetti et al., 2011) was demonstrated, as well as the activation of zebrafish brain AChE by ethanol (Rico et al., 2007) and microcystin-LR exposure (Kist et al., 2012).

There are controversial results concerning the effects of organochlorine endosulfan exposure and AChE activity in fish. In one hand, it was demonstrated that AChE activity was not altered in the serum of *Clarias gariepinus* (Ezemonye and Ikpesu, 2011) and in brain of *Jenynsia multidentata* (Ballesteros et al., 2009) and *Cichlasoma dimerus* (Da Cuña et al., 2011). On the other hand, AChE activity was inhibited in brain of *Lepomis macrochirus* (Dutta and Arends, 2003) and *Labeo rohita* (Kumar et al., 2011) and in muscle of *Jenynsia multidentata* (Ballesteros et al., 2009).

There is still less information concerning the effects of endosulfan exposure and behavior parameters in fish species. Endosulfan induces reduced feeding behaviors of *Thalassoma pavo* (Giusti et al., 2005) and changes in spontaneous swimming activity of *Jenynsia multidentata* (Ballesteros et al., 2009).

Therefore, considering that: (i) endosulfan is still widely in use in many developing countries, (ii) the neurotoxic effects of endosulfan exposure are far from being completely understood, (iii) measurement of AChE activity in organisms is used worldwide as a biomarker of environmental contamination, (iv) there are controversial results concerning the effects promoted by endosulfan exposure in AChE activity, and that (v) zebrafish is a well-established organism model for toxicological analysis, the aim of the present study was to evaluate the effects of endosulfan in brain AChE activity and its gene expression pattern. Furthermore, we have analyzed the effects of endosulfan exposure in distinct parameters of zebrafish swimming activity and in long-term memory formation.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Endosulfan (6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-methano-2,3,4-benzodioxathiepin-3-oxide), number 067-09-01350, was purchased from a commercial supplier (COTRIJUI, RS, Brazil). Trizma Base, ethylenedioxy-diethylene-dinitrilo-tetraacetic acid (EDTA), ethylene glycol bis(beta amino ethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), sodium citrate, Coomassie Blue G, bovine serum albumin, acetylthiocholine, and 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). TRIzol[®] reagent, Platinum[®] Taq DNA Polymerase and SYBR[®] Green I were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). ImProm-II[™] Reverse Transcription System was purchased from Promega (Madison, USA). All other reagents used were of analytical grade.

2.2. Animals

Adult wild-type zebrafish (*Danio rerio*, Cyprinidae) of both sexes (6–9 months-old) were obtained from a specialized supplier (Redfish Agroloja, RS, Brazil). Animals were kept at a density of up to five animals per liter in 50 L housing tanks with tap water that was previously treated with Tetra's AquaSafe[®] (to neutralize chlorine, chloramines, and heavy metals present in the water that could be harmful to fish/supplier Redfish Agroloja) and continuously aerated (7.20 mg O₂/L) at 26 ± 2 °C, under a 14/10 h light/dark controlled photoperiod. Animals were acclimated for at least two weeks before the experiments and were fed three times a day with TetraMin Tropical Flake fish food[®] (supplier Redfish Agroloja). The fish were maintained healthy and free of any signs of disease and were used according to the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" published by the US National Institutes of Health. All procedures in the present study were approved by the Animal Ethics Committee of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), protocol number 10/00211-CEUA.

2.3. In vitro assay

In vitro assays were performed as previously described (Seibt et al., 2009; Siebel et al., 2010). Briefly, endosulfan was added to the reaction medium before the preincubation with the enzyme-containing lysate from zebrafish brain homogenate and maintained during the enzyme assays. Endosulfan was tested at a final concentration of 0.6, 1.2, 2.4, 5.0, 10.0 and 50.0 µg/L. For the control group, the enzyme assay was performed in the absence of endosulfan (*i.e.* no pesticide was added to the reaction medium).

2.4. In vivo assay

The *in vivo* exposures were performed in 2-L aquariums (10 fish per aquarium). Fish were exposed to different endosulfan concentrations (0.6, 0.9, 1.2 and 2.4 µg/L) dissolved in water for

Table 1
PCR primers design.

Proteins	Primer sequences (5'-3')	Accession number (mRNA)
EF1 α^a	F-CTGGAGGCCAGCTCAAACAT R-ATCAAGAAGAGTAGTACCGCTAGCATTAC	NSDART0000023156
Rpl13 α^a	F-TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC R-AGACGCACAATCTTGAGAGCAG	NM_212784
β -Actin a	F-CGAGCTGTCTCCCATCCA R-TACCAACGTAGCTGCTTTCTG	ENS DART000005194
AChE b	F-GCTAATGAGCAAAGCATGTGGGCTTG R-TATCTGTGATGTTAAGCAGACGAGGCAGG	NP_571921

^a According to Tang et al. (2007).^b Designed by authors.

24 and 96 h and immediately after the exposure, they were euthanized by decapitation. For the control group the animals were exposed only to water, after which they were euthanized. The endosulfan concentrations and the exposure periods were chosen based on a previous study using *Cichlasoma dimerus* (Da Cuña et al., 2011). The water/endosulfan of the aquarium was changed after each 24 h of exposure in order to circumvent the endosulfan's low persistence (half-time) in water.

2.5. Determination of AChE activity

Zebrafish were euthanized and whole brain tissue was dissected. The brain tissue (brains from two individuals were used for each sample) was homogenized with in 60 volumes (v/w) of Tris–citrate buffer (50 mM Tris, 2 mM EGTA, 2 mM EGTA, pH 7.4, adjusted with citric acid) in a glass Teflon homogenizer. The rate of acetylthiocholine hydrolysis (ACSh, 0.88 mM) was assessed in a final volume of 300 μ L with 11 mM phosphate buffer, pH 7.5, and 0.22 mM DTNB using a method previously described (Ellman et al., 1961). Before the addition of substrate, samples containing protein (5 μ g) and the reaction medium described above were preincubated for 10 min at 25 $^{\circ}$ C. The hydrolysis of substrate was monitored by the formation of thiolate dianion of DTNB at 412 nm for 2–3 min (intervals of 30 s) in a microplate reader. Controls without the homogenate preparation were performed in order to determine the non-enzymatic hydrolysis of the substrate. The linearity of absorbance against time and protein concentration was previously determined. AChE activity was expressed as micro-moles of thiocholine (SCh) released per hour per milligram of protein. All enzyme assays were evaluated in triplicate and at least four independent experiments were performed.

2.6. Protein determination

Protein was measured by the Coomassie blue method (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as standard.

2.7. Gene expression analysis by quantitative real time RT-PCR (RT-qPCR)

Immediately after 96 h of exposure to 2.4 μ g endosulfan/L, the animals were euthanized by decapitation. For each sample, a pool of three zebrafish whole brains was used. Total RNA was isolated with Trizol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. The total RNA was quantified by spectrophotometry and the cDNA was synthesized with ImProm-II[™] Reverse Transcription System (Promega) from 1 μ g total RNA, following the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed using SYBR[®] Green I (Invitrogen) to detect double-strand cDNA synthesis. Reactions were done in a volume of 25 μ L using 12.5 μ L of diluted cDNA (1:100 for *EF1 α* , *Rpl13 α* and *β -actin*; 1:20 for *ache*), containing a final concentration of 0.2 \times

SYBR[®] Green I (Invitrogen), 100 μ M dNTP, 1 \times PCR Buffer, 3 mM MgCl₂, 0.25 U Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen) and 200 nM of each reverse and forward primers (Table 1). The PCR cycling conditions were: an initial polymerase activation step for 5 min at 95 $^{\circ}$ C, 40 cycles of 15 s at 95 $^{\circ}$ C for denaturation, 35 s at 60 $^{\circ}$ C for annealing and 15 s at 72 $^{\circ}$ C for elongation. At the end of cycling protocol, a melting-curve analysis was included and fluorescence measured from 60 to 99 $^{\circ}$ C. Relative expression levels were determined with 7500 Fast Real-Time System Sequence Detection Software v.2.0.5 (Applied Biosystems). The efficiency per sample was calculated using LinRegPCR 11.0 Software (<http://LinRegPCR.nl>) and the stability of the references genes, *EF1 α* , *Rpl13 α* and *β -actin* (*M-value*) and the optimal number of reference genes according to the pairwise variation (*V*) were analyzed by GeNorm 3.5 Software (<http://medgen.ugent.be/genorm/>). Relative RNA expression levels were determined using the 2^{− $\Delta\Delta$ CT} method.

2.8. Behavioral assessment

Behavioral testing of locomotion was realized after 96 h of exposure to 2.4 μ g endosulfan/L or water (control group) during the light period between 9:00 a.m. and 2:00 p.m. Animals were individually placed in the experimental tank (30 cm L \times 15 cm H \times 10 cm W), habituated to the tank for 30 s, as previously described (Gerlai et al., 2000). The animals' locomotor activity was recorded on video for 5 min after the habituation period. The tank was divided into equal sections with four vertical lines and one horizontal line, and the following behavior patterns were measured: number of line crossings (vertical and horizontal lines), distance traveled (m), mean speed (m/s) and absolute turn angle. The video was analyzed using ANY-Maze software (Stoelting. Co., Wood Dale, IL, USA).

2.9. Inhibitory avoidance

Long-term memory was evaluated by using the inhibitory avoidance (IA) protocol previously described in detail by Blank et al. (2009). After 96 h of treatment, control and 2.4 μ g endosulfan/L group, were individually trained and tested in a white/dark compartment IA apparatus (18 cm L \times 9 cm H \times 7 cm W). On training session, animals were placed in the white side of the tank while the partition between compartments was closed. After 1 min of habituation to the new environment the partition was raised, allowing fish to cross to the dark side of the tank. When animals entered the dark side with their entire body, the sliding partition was closed and a pulsed electric shock (3 \pm 0.2 V) was administered for 5 s. Fish were then removed from the apparatus and placed in the dedicated temporary tank. Animals were tested 24 h after training. The test session repeated the training protocol except that no shock was administered and animals immediately removed from the dark compartment. The latency to completely enter the dark compartment

was measured on both sessions and the test latencies used as an index of long-term memory retention.

2.10. Statistical analysis

AChE activity was expressed as the mean \pm S.E.M. and analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). *Post hoc* comparisons were made using Tukey's test. Molecular and locomotion data was presented as the mean \pm S.E.M. and analyzed by Student's *t*-test. Inhibitory avoidance memory data were presented as mean \pm S.E.M. and latencies of groups were compared using Kruskal–Wallis followed by Mann–Whitney *U* tests. Significance was set at $p \leq 0.05$ in all assays.

3. Results

3.1. Brain AChE activity

The effect of different endosulfan concentrations (0.6, 1.2 and 2.4 $\mu\text{g/L}$) and times of exposure (24 and 96 h) on brain AChE activity was demonstrated by performing *in vivo* experiments using adult zebrafish. None of the concentrations tested altered AChE activity when zebrafish were exposed to endosulfan during 24 h (Fig. 1A). Nevertheless, after 96 h of exposition, fish in the 2.4 μg endosulfan/L group presented a significant decrease in AChE

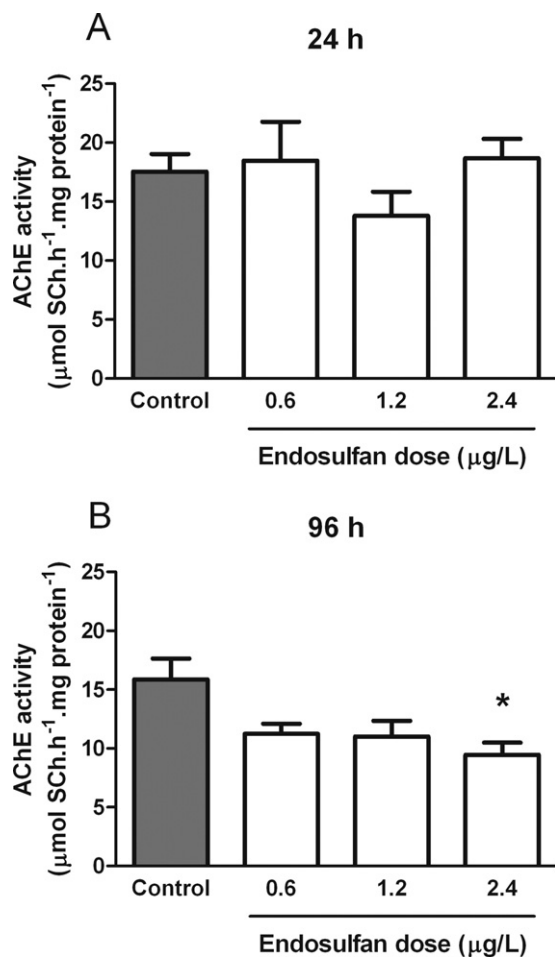


Fig. 1. *In vivo* AChE activity. *In vivo* AChE activity in zebrafish brain after 24 (A) and 96 h (B) of endosulfan exposure at distinct concentrations (0.6–2.4 $\mu\text{g/L}$). Bars represent the mean \pm S.E.M. $n=7$. The specific enzyme activity is reported as micromoles of thiocholine released per hour per milligram of protein. The asterisk (*) indicates a significant difference compared to control group ($p \leq 0.05$).

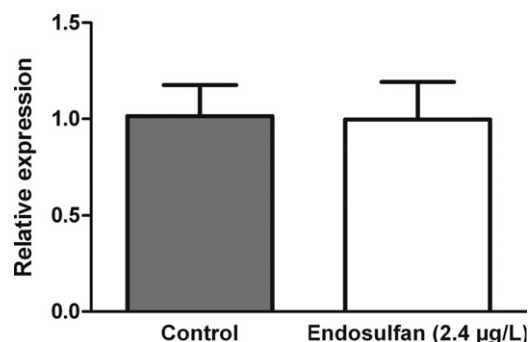


Fig. 2. RT-qPCR analysis. Relative *ache* expression profile after endosulfan exposure (2.4 $\mu\text{g/L}$ for 96 h) on zebrafish brain. Bars represent the mean \pm S.E.M. $n=4$.

activity ($9.44 \pm 1.038 \mu\text{mol SCh h}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$; $p = 0.0205$) when compared to the control group ($15.87 \pm 1.768 \mu\text{mol SCh h}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$; $p = 0.0205$) which corresponds to approximately 40% (Fig. 1B).

The down-regulation of AChE activity after exposure to 2.4 μg endosulfan/L could be a consequence of transcriptional control. In order to determine if transcriptional regulation of *ache* has occurred, a RT-qPCR analysis was carried out. The results have shown that *ache* transcript levels in the 2.4 μg endosulfan/L group were not decreased when compared to the control group ($p = 0.943$; Fig. 2) suggesting that the down-regulation of brain AChE is not directly related with the transcriptional control.

In order to evaluate if endosulfan could have a direct effect on the enzyme, we tested the *in vitro* effect of endosulfan on AChE activity in zebrafish brain. The results showed that none of the endosulfan concentrations tested (0.6, 1.2, 2.4, 5.0, 10.0 and 50.0 $\mu\text{g/L}$) effectively altered AChE activity ($p = 0.8383$; Fig. 3).

3.2. Swimming performance and memory

Considering that ACh is known to play a major role in the regulation of locomotor control, we evaluated four parameters of zebrafish swimming activity in the 5-min tank diving behavioral test. Exposure to 2.4 μg endosulfan/L during 96 h decreased line crossings ($\approx 21\%$, 273.7 ± 28.12 number of line crossings compared to the control group 344.6 ± 21.30 , $p = 0.0483$), traveled distance ($\approx 20\%$, 23.44 ± 2.127 meters compared to the control group 29.39 ± 1.585 , $p = 0.0281$), mean speed ($\approx 25\%$, 0.03 ± 0.003 m/s compared to the control group 0.04 ± 0.002 , $p = 0.0275$) and body turn angle ($\approx 21\%$, $69,940 \pm 4871$ absolute turn angle compared to the control group $88,010 \pm 4560$, $p = 0.0114$) (Fig. 4).

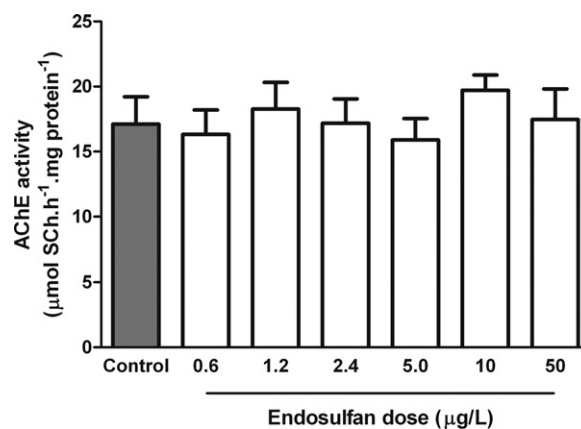


Fig. 3. *In vitro* AChE activity. *In vitro* effect of different concentrations of endosulfan (0.6–50 $\mu\text{g/L}$) on ACh hydrolysis in zebrafish brain. Bars represent the mean \pm S.E.M. $n=5$.

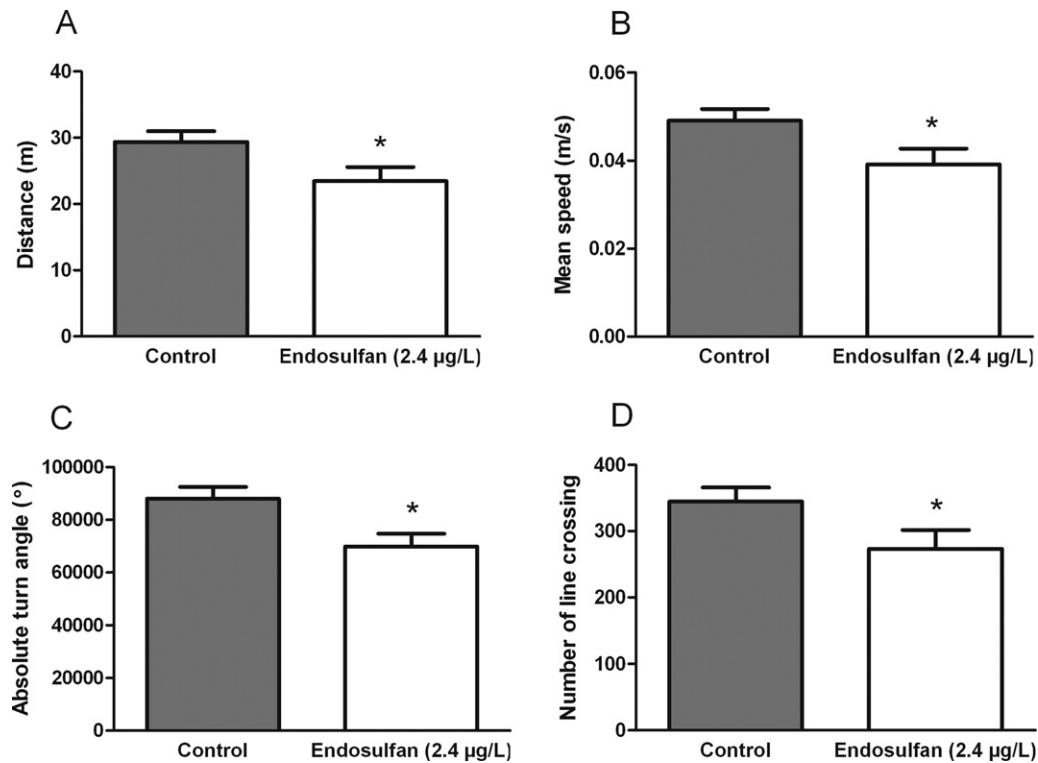


Fig. 4. Swimming performance. Effect of endosulfan exposure (2.4 µg/L for 96 h) on the distance traveled (A), mean speed (B), absolute turn angle (C) and number of line crossings (D) determined during 5 min of video recording in the tank-diving behavioral test. Bars represent the mean ± S.E.M. $n = 16$. The asterisk (*) indicates a significant difference compared to control group ($p \leq 0.05$).

In addition, taking into account cholinergic system's crucial modulatory role in higher cognitive functions, such as memory formation (Hasselmo, 2006), we have also evaluated the effects of the endosulfan exposure over long-term memory formation on the inhibitory avoidance paradigm. For that, two groups were established: control group ($n = 22$) and 2.4 µg endosulfan/L ($n = 23$). The 2.4 µg endosulfan/L exposure (during 96 h) neither altered training session ($p = 0.1679$) nor test session ($p = 0.7221$) (Fig. 5).

4. Discussion

In the present study, we have evaluated the effect of different endosulfan concentrations (0.6, 1.2 and 2.4 µg/L) and different

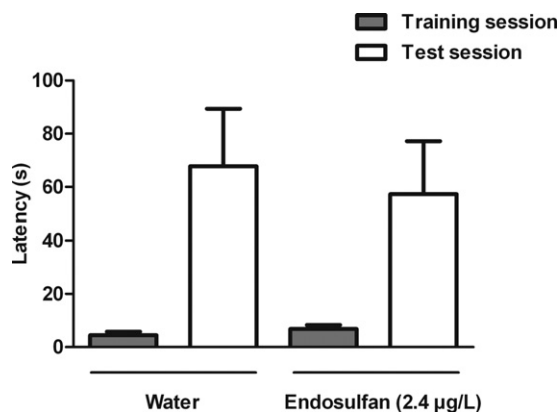


Fig. 5. Long-term memory. Effect of endosulfan exposure (2.4 µg/L for 96 h) on latency to cross to dark compartment in training and long-term memory test sessions in the inhibitory avoidance paradigm. Bars represent the mean ± S.E.M. $n = 22$.

exposure periods (24 and 96 h) on AChE activity and on *ache* expression in zebrafish brain. After 96 h of exposition, fish in the 2.4 µg endosulfan/L group presented a significant decrease in AChE activity. The RT-qPCR analysis demonstrated that endosulfan exposure did not alter *ache* mRNA levels in zebrafish brain. In addition, the *in vitro* assays did not reveal any significant changes in AChE activity. It is important to emphasize that *in vitro* experiments do not evaluate the influence of other mechanisms such as cell signaling pathways. Altogether, our results indicate that the effect of endosulfan on brain AChE activity is neither related to *ache* inhibition nor to the direct action of this pesticide on the protein, but probably involves a posttranscriptional or post-translational modulation of this enzymatic activity. Another possibility to explain our results is that endosulfan exposure may be causing destruction to cholinergic neurons, and therefore resulting in loss of AChE activity. The identification of some pathology of the brain or even the demonstration that the number of cholinergic neurons was decreased in selected brain regions after endosulfan exposure could give support to this supposition.

There are inconclusive results regarding the effects of endosulfan exposure and AChE activity in fish. It was demonstrated that AChE activity was not altered in the serum of juveniles of *Clarias gariepinus* when exposed (from seven to 28 days) to distinct concentrations of endosulfan (0.00, 0.0025, 0.005, 0.0075 and 0.01 µg/L) (Ezemonye and Ikpesu, 2011). In addition, brain AChE activity was not changed in the freshwater species *Cichlasoma dimerus* exposed to different concentrations of endosulfan (from 0.25 to 4.00 µg/L) (Da Cuña et al., 2011). In contrast, brain AChE activity inhibition in juvenile bluegill sunfish *Lepomis macrochirus* after endosulfan exposure (1.0 µg/L) occurred in a time-related relationship (Dutta and Arends, 2003). Brain AChE activity was inhibited in *Labeo rohita* fingerlings exposed to low-dose endosulfan (Kumar et al., 2011). Even more interesting

were the results obtained by Ballesteros et al. (2009) where AChE activity significantly decreased in muscle of adult onesided livebearer (*Jenynsia multidentata*) after a sublethal endosulfan exposure while no significant changes were observed in brain. The results presented herein reinforce AChE activity inhibition as a pathway of endosulfan-induced toxicity in brain of fish species.

It is well-known that inhibition of AChE leads to a marked increase in the ACh accumulation in the brain causing an overstimulation of cholinergic receptors. As a result, an overall decline in neural and muscular control occurs. In addition, there is a large body of evidence in the literature associating changes in normal behavioral patterns with neurotoxic effects of exposure to pollutants. However, at present, only few studies dealing with the effects of endosulfan exposure and behavior parameters in fish species were published. Endosulfan exposures impaired startle response and escape from predation of *Oryzias latipes* (Carlson et al., 1998). The results obtained by Gormley and Teather (2003) suggested that short-term exposure to endosulfan (0.01, 0.1 and 1 µg/L) for 24 h beginning either 4–6 h postfertilization or 4–6 h posthatch have long-term effects on growth, behavior, and reproduction of the *Oryzias latipes*. Endosulfan exposure (1.3 µg/L) for one week induces reduced feeding behaviors of *Thalassoma pavo* (Giusi et al., 2005). Decline in the traveled distance after exposure to endosulfan (1 µg/L) for 240 h together with an increase in lipid peroxidation in brain of *Cyprinus carpio* was demonstrated by Rehman (2006). Ballesteros et al. (2009) reported that endosulfan exposure (from 0.072 and 1.4 µg/L) decreased the swimming activity of *Jenynsia multidentata*.

Our results showed that exposure to 2.4 µg endosulfan/L for 96 h, a condition that resulted in brain AChE inhibition, also impaired all exploratory parameters evaluated. Endosulfan exposed animals showed a general decreased exploratory ability, including reduced mean speed which resulted in lower traveled distance and line crossings in the evaluated period. Interestingly, it also affected animals swimming body turn angles, suggesting it significantly impairs animals' exploratory performance, and potentially compromises their ecological and interspecific interaction. Despite cholinergic modulation of learning and memory processes, no effect of endosulfan exposure was observed in the inhibitory avoidance performance. This result suggests that the decreased AChE activity was not sufficient to compromise long-term memory formation in this task, and can be attributed to the task rapid acquisition that does not depend on complex strategies, sustained attention, and intense exploration of the apparatus or endurance. These findings provide further evidence of the deleterious effects of endosulfan exposure in the nervous system and suggest that additional studies are needed to better understand its extent and ecological and physiological impacts.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and DECIT/SCTIEMS through CNPq and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (Proc. FAPERGS 10/0036-5-PRONEX). JWB, LWK, MBA and RLO were recipients of fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). R.S.F. was recipient of fellowships from CNPq. CDB, MRV and MRB are research fellows from CNPq.

References

- Bajpayee M, Pandey AK, Zaidi S, Musarrat J, Parmar D, Mathur N, et al. DNA damage and mutagenicity induced by endosulfan and its metabolites. *Environ Mol Mutagen* 2006;47:682–92.
- Ballesteros ML, Durando PE, Nores ML, Díaz MP, Bistoni MA, Wunderlin DA. Endosulfan induces changes in spontaneous swimming activity and acetylcholinesterase activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Environ Pollut* 2009;157:1573–80.
- Bertrand C, Chatonnet A, Takke C, Yan YL, Postlethwait J, Toutant JP, et al. Zebrafish acetylcholinesterase is encoded by a single gene localized on linkage group 7 Gene structure and polymorphism; molecular forms and expression pattern during development. *J Biol Chem* 2001;276:464–74.
- Blank M, Guerin LD, Cordeiro RF, Vianna MRM. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiol Learn Mem* 2009;92:529–34.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- Carlson RW, Bradbury SP, Drummond RA, Hammermeister DE. Neurological effects on startle response and escape from predation by medaka exposed to organic chemicals. *Aquat Toxicol* 1998;43:51–68.
- Carriger JF, Hoang TC, Rand GM, Gardinali PR, Castro J. Acute toxicity and effects analysis of endosulfan sulfate to freshwater fish species. *Arch Environ Contam Toxicol* 2011;60:281–9.
- Chopra AK, Sharma MK, Chamoli S. Bioaccumulation of organochlorine pesticides in aquatic system—an overview. *Environ Monit Assess* 2011;173:905–16.
- Da Cunha RH, Rey Vázquez G, Piol MN, Guerrero NV, Maggese MC, Lo Nostro FL. Assessment of the acute toxicity of the organochlorine pesticide endosulfan in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Ecotoxicol Environ Saf* 2011;74:1065–73.
- Dutta HM, Arends DA. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environ Res* 2003;91:157–62.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7:88–95.
- Ezemonye LIN, Ikpesu TO. Evaluation of sub-lethal effects of endosulfan on cortisol secretion, glutathione S-transferase and acetylcholinesterase activities in *Clarias gariepinus*. *Food Chem Toxicol* 2011;49:1898–903.
- Fukuto TR. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ Health Perspect* 1990;87:245–54.
- Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;67:773–82.
- Giusi G, Facciolo RM, Alò R, Carelli A, Madeo M, Brandmayr P, et al. Some environmental contaminants influence motor and feeding behaviors in the ornate wrasse (*Thalassoma pavo*) via distinct cerebral histamine receptor subtypes. *Environ Health Perspect* 2005;113:1522–9.
- Gormley KL, Teather KL. Developmental, behavioral, and reproductive effects experienced by Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to short-term exposure to endosulfan. *Ecotoxicol Environ Saf* 2003;54:330–8.
- Hasselmo ME. The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol* 2006;16:710–5.
- Hernández PP, Allende ML. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for studying the genetic basis of copper toxicity, deficiency, and metabolism. *Am J Clin Nutr* 2008;88:835S–9S.
- Kist LW, Rosemberg DB, Pereira TCB, de Azevedo MB, Richetti SK, de Castro Leão J, et al. Microcystin-LR acute exposure increases AChE activity via transcriptional ache activation in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2012;155:247–52.
- Kumar N, Jadhao SB, Chandan NK, Kumar K, Jha AK, Bhushan S, et al. Dietary choline, betaine and lecithin mitigates endosulfan-induced stress in *Labeo rohita* fingerlings. *Fish Physiol Biochem* 2011 [Epub ahead of print].
- Miglioranza KSB, González Sagrario M, de los A, Aizpún de Moreno JE, Moreno VJ, Escalante AH, et al. Agricultural soil as a potential source of input of organochlorine pesticides into a nearby pond. *Environ Sci Pollut Res Int* 2002;9:250–6.
- Neuparth T, Bickham JW, Theodorakis CW, Costa FO, Costa MH. Endosulfan-induced genotoxicity detected in the Gilthead Seabream, *Sparus aurata* L. by means of flow cytometry and micronuclei assays. *Bull Environ Contam Toxicol* 2006;76:242–8.
- Rand GM, Carriger JF, Gardinali PR, Castro J. Endosulfan and its metabolite, endosulfan sulfate, in freshwater ecosystems of South Florida: a probabilistic aquatic ecological risk assessment. *Ecotoxicology* 2010;19:879–900.
- Rehman S. Endosulfan toxicity and its reduction by selenium: a behavioral, hematological and peroxidative stress evaluation. *Int J Toxicol* 2006;3.
- Richetti SK, Rosemberg DB, Ventura-Lima J, Monserrat JM, Bogo MR, Bonan CD. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *Neurotoxicology* 2011;32:116–22.
- Rico EP, Rosemberg DB, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. *Toxicol Lett* 2007;174:25–30.
- Rico EP, Rosemberg DB, Senger MR, Arizi M, de B, Bernardi GF, et al. Methanol alters ecto-nucleotidases and acetylcholinesterase in zebrafish brain. *Neurotoxicol Teratol* 2006;28:489–96.
- Seibt KJ, Oliveira RdaL, Rico EP, Dias RD, Bogo MR, et al. Antipsychotic drugs inhibit nucleotide hydrolysis in zebrafish (*Danio rerio*) brain membranes. *Toxicol In Vitro* 2009;23:78–82.

- Siebel AM, Rico EP, Capiotti KM, Piato AL, Cusinato CT, Franco TMA, et al. In vitro effects of antiepileptic drugs on acetylcholinesterase and ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Toxicol In Vitro* 2010;24:1279–84.
- Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase—new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:294–302.
- Tang R, Dodd A, Lai D, McNabb WC, Love DR. Validation of Zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta Biochim Biophys Sin* 2007;39:384–90.
- Tellez-Bañuelos MC, Santerre A, Casas-Solis J, Bravo-Cuellar A, Zaitseva G. Oxidative stress in macrophages from spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of endosulfan. *Fish Shellfish Immunol* 2009;27:105–11.
- Van Dyk JS, Pletschke B. Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. *Chemosphere* 2011;82:291–307.
- Wan MT, Kuo J-N, Buday C, Schroeder G, Van Aggelen G, Pasternak J. Toxicity of alpha-, beta-, (alpha + beta)-endosulfan and their formulated and degradation products to *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus kisutch*, and biological implications in streams. *Environ Toxicol Chem* 2005;24:1146–54.
- Yavuz Y, Yurumez Y, Küçük H, Ela Y, Yüksel S. Two cases of acute endosulfan toxicity. *Clin Toxicol (Phila)* 2007;45:530–2.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Endosulfan é um agrotóxico da classe dos organoclorados, caracterizando-se como um inseticida e acaricida utilizado em diversos tipos de culturas, tais como: vegetais, tabaco, algodão, frutas e nozes. É um composto químico que contém uma mistura de dois isômeros biologicamente ativos (70% alfa e 30% beta endosulfan). O principal metabólito ambiental encontrado na água, sedimentos e tecidos é o endosulfan sulfato resultante de um processo de oxidação (Rand et al., 2010; Li et al., 2011).

Este pesticida é extremamente tóxico para peixes (Tellez-Bañuelos et. al, 2010), sendo considerado um importante agente de toxicidade aguda ao passo que as manifestações mais comuns são as neurológicas, embora possam ocorrer outras disfunções orgânicas (Moses and Peter, 2010).

No Capítulo 2, foi testada a hipótese relativa à modulação da atividade da AChE cerebral em relação à exposição do *zebrafish* ao agrotóxico endosulfan, devido ao seu uso como bioindicador de exposição ambiental, e, ainda, foi avaliada a influência no comportamento relativo à locomoção e memória de longo prazo.

Já que resultados sobre a exposição ao endosulfan em relação à atividade de AChE em peixes são controversos, foi realizada a exposição do *zebrafish* nos períodos de 24 e 96 h, observando-se, no período maior, a diminuição da atividade da AChE em 2,4 µg/L de endosulfan. Em relação aos níveis de mRNA no gene *ache*, a análise de RT-qPCR não demonstrou alteração no cérebro de *zebrafish*, portanto não há relação direta com a inibição da regulação da AChE observada neste estudo e o controle transcricional. No ensaio *in vitro*, não foram observadas mudanças significativas na atividade da AChE, sugerindo que o endosulfan não atua diretamente sobre a enzima.

Uma vez que a AChE possui a função de hidrolisar a acetilcolina liberada na fenda sináptica, caso sua atividade esteja diminuída devido à interferência de substâncias, ocorrerá um acúmulo deste neurotransmissor, causando um grande estímulo nos receptores colinérgicos, ocasionando um declínio geral no controle neural e muscular.

Em relação à exposição ao endosulfan e parâmetros comportamentais em peixes, há poucas informações disponíveis. Foram analisados quatro parâmetros relacionados à locomoção (distância viajada, velocidade média, mudanças de

ângulo e número de linhas cruzadas), onde foi demonstrada a diminuição dos mesmos quando se comparou o grupo tratado com o controle sob uma exposição a 2,4 µg/L de endosulfan durante 96h, concluindo-se que os animais expostos apresentaram um decréscimo da habilidade exploratória, podendo comprometer sua interação interespecífica e ecológica. Realizou-se uma análise a fim de verificar possíveis alterações na memória de longo prazo dos peixes e os resultados indicam que essa exposição não compromete o desempenho dos animais na esQUIVA inibitória, provavelmente, por influência do tamanho reduzido do aparato e das sessões de treino e teste com duração curta.

Os achados deste trabalho fornecem informações adicionais sobre efeitos nocivos da exposição ao endosulfan no Sistema Nervoso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler M, Sweeney RE, Hamilton TA, Lockridge O, Duysen EG, Purcell AL, et al. Role of acetylcholinesterase on the structure and function of cholinergic synapses: insights gained from studies on knockout mice. *Cell Mol Neurobiol.* 2011;31(6):909-20.
- ANVISA. Nota técnica - Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo Endosulfan. 2009 [acesso em 25 de junho 2010]; Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/0984690042f586f88a239e536d6308db/NT+Endossulfan.pdf?MOD=AJPERES>.
- Ballesteros ML, Durando PE, Nores ML, Díaz MP, Bistoni MA, Wunderlin DA. Endosulfan induces changes in spontaneous swimming activity and acetylcholinesterase activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Environ Pollut.* 2009;157(5):1573-80.
- Bajpayee M, Pandey AK, Zaidi S, Musarrat J, Parmar D, Mathur N, et al. DNA damage and mutagenicity induced by endosulfan and its metabolites. *Environ Mol Mutagen* 2006;47:682–92.
- Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* 2000;10(9):1351-8.
- Behra M, Cousin X, Bertrand C, Vonesch JL, Biellmann D, Chatonnet A, et al. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nat Neurosci.* 2002;5(2):111-8.
- Belyaeva NF, Kashirtsev VN, Medvedeva NV, Khudoklinova YY, Ipatova OM, Archakov AI. Zebrafish as a Model System for Biomedical Studies. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry.* 2009;3(4):7.
- Bertrand C, Chatonnet A, Takke C, Yan YL, Postlethwait J, Toutant JP, et al. Zebrafish acetylcholinesterase is encoded by a single gene localized on linkage group 7. Gene structure and polymorphism; molecular forms and expression pattern during development. *J Biol Chem.* 2001;276(1):464-74.
- Best JD, Alderton WK. Zebrafish: An *in vivo* model for the study of neurological diseases. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2008;4(3):567-76.
- Brunelli E, Bernabò I, Berg C, Lundstedt-Enkel K, Bonacci A, Tripepi S. Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. *Aquat Toxicol.* 2009;91(2):135-42.
- Busch W, Duis K, Fenske M, Maack G, Legler J, Padilla S, et al. The zebrafish embryo model in toxicology and teratology, September 2–3, 2010, Karlsruhe, Germany. *Reprod Toxicol.* 2011;31(4):585-8.

Chakraborty C, Hsu CH, Wen ZH, Lin CS, Agoramoorthy G. Zebrafish: a complete animal model for in vivo drug discovery and development. *Curr Drug Metab.* 2009;10(2):116-24.

Chopra AK, Sharma MK, Chamoli S. Bioaccumulation of organochlorine pesticides in aquatic system--an overview. *Environ Monit Assess.* 2011;173(1-4):905-16.

Clemente D, Arenzana FJ, Sánchez-González R, Porteros A, Aijón J, Arévalo R. Comparative analysis of the distribution of choline acetyltransferase in the central nervous system of cyprinids. *Brain Res Bull.* 2005;66(4-6):546-9.

Cooney MA, Buck Louis GM, Hediger ML, Vexler A, Kostyniak PJ. Organochlorine pesticides and endometriosis. *Reprod Toxicol.* 2010;30(3):365-9.

Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. *Acetylcholine*. 6 ed. Oxford: Oxford University Press; 1991. p. 190-213.

Crawford AD, Esguerra CV, de Witte PA. Fishing for drugs from nature: zebrafish as a technology platform for natural product discovery. *Planta Med.* 2008;74(6):624-32.

Da Cuña RH, Rey Vázquez G, Piol MN, Guerrero NV, Maggese MC, Lo Nostro FL. Assessment of the acute toxicity of the organochlorine pesticide endosulfan in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2011;74(4):1065-73.

Daglioglu N, Gulmen MK, Akcan R, Efeoglu P, Yener F, Unal I. Determination of organochlorine pesticides residues in human adipose tissue, data from Cukurova, Turkey. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2010;85(1):97-102.

DeMicco A, Cooper KR, Richardson JR, White LA. Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides in zebrafish embryos. *Toxicol Sci.* 2010;113(1):177-86.

Dhananjayan V, Muralidharan S. Levels of organochlorine pesticide residues in blood plasma of various species of birds from India. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2010;85(2):129-36.

Dou C, Zhang J. Effects of lead on neurogenesis during zebrafish embryonic brain development. *J Hazard Mater.* 2011;194:277-82.

Downes GB, Granato M. Acetylcholinesterase function is dispensable for sensory neurite growth but is critical for neuromuscular synapse stability. *Dev Biol.* 2004;270(1):232-45.

Dutta HM, Arends DA. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environ Res.* 2003;91(3):157-62.

Edwards JG, Michel WC. Odor-stimulated glutamatergic neurotransmission in the zebrafish olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 2002;454(3):294-309.

Ellett F, Lieschke GJ. Zebrafish as a model for vertebrate hematopoiesis. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10(5):563-70.

Ezemonye LI, Ikpesu TO. Evaluation of sub-lethal effects of endosulfan on cortisol secretion, glutathione S-transferase and acetylcholinesterase activities in *Clarias gariepinus*. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(9):1898-903.

Fernandez-Alvarez M, Lamas JP, Garcia-Chao M, Garcia-Jares C, Llompert M, Lores M, et al. Monitoring of pesticide residues in dairy cattle farms from NW Spain. *J Environ Monit.* 2010;12(10):1864-75.

Fernández-Bringas LM, Ponce-Vélez G, Calva LG, Salgado-Ugarte IH, Botello AV, Díaz González G. Organochlorine pesticides in lacustrine sediments and tilapias of Metztitlan, Hidalgo, Mexico. *Rev Biol Trop.* 2008;56(3):1381-90.

Ferrando MD, Sancho E, Andreu-Moliner E. Comparative acute toxicities of selected pesticides to *Anguilla anguilla*. *J Environ Sci Health B.* 1991;26(5-6):491-8.

Fracácio R, Campagna AF, Rodrigues BK, Verani NF, Espíndola ELG. Avaliação da Toxicidade do Endosulfan Sulfato sobre Juvenis de *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae). *J Bras Soc Ecotoxicol* 2008;3(1):6.

García-Ayllón MS, Cauli O, Silveyra MX, Rodrigo R, Candela A, Compañ A, et al. Brain cholinergic impairment in liver failure. *Brain.* 2008;131(Pt 11):2946-56.

Gerlai R. Zebra fish: an uncharted behavior genetic model. *Behav Genet.* 2003;33(5):461-8.

Gilden RC, Huffling K, Sattler B. Pesticides and health risks. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* 2010;39(1):103-10.

Giusi G, Facciolo RM, Alò R, Carelli A, Madeo M, Brandmayr P, et al. Some environmental contaminants influence motor and feeding behaviors in the ornate wrasse (*Thalassoma pavo*) via distinct cerebral histamine receptor subtypes. *Environ Health Perspect.* 2005;113(11):1522-9.

Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4(5):504-12.

Gómez S, Gorri D, Irabien A. Organochlorine pesticide residues in sediments from coastal environment of Cantabria (northern Spain) and evaluation of the Atlantic Ocean. *Environ Monit Assess.* 2011;176(1-4):385-401.

Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol.* 2004;74(6):363-96.

Gui W, Dong Q, Zhou S, Wang X, Liu S, Zhu G. Waterborne exposure to clodinafop-propargyl disrupts the posterior and ventral development of zebrafish embryos. *Environ Toxicol Chem.* 2011;30(7):1576-81.

Guo S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes Brain Behav.* 2004;3(2):63-74.

Gutierrez MF, Gagneten AM, Paggi JC. Exposure to sublethal chromium and endosulfan alter the diel vertical migration (DVM) in freshwater zooplankton crustaceans. *Ecotoxicology.* 2012;21(1):37-47.

Han Z, Jiao S, Kong D, Shan Z, Zhang X. Effects of β -endosulfan on the growth and reproduction of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Chem.* 2011;30(11):2525-31.

Harrington AM, Hutson JM, Southwell BR. Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptors in the enteric nervous system. *Prog Histochem Cytochem.* 2010;44(4):173-202.

Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci.* 2005;86(1):6-19.

Hoff EI, van Oostenbrugge RJ, Otte WM, van der Marel K, Steinbusch HW, Dijkhuizen RM. Pharmacological magnetic resonance imaging of muscarinic acetylcholine receptor activation in rat brain. *Neuropharmacology.* 2010;58(8):1252-7.

Jacobson SM, Birkholz DA, McNamara ML, Bharate SB, George KM. Subacute developmental exposure of zebrafish to the organophosphate pesticide metabolite, chlorpyrifos-oxon, results in defects in Rohon-Beard sensory neuron development. *Aquat Toxicol.* 2010;100(1):101-11.

Jospin M, Qi YB, Stawicki TM, Boulin T, Schuske KR, Horvitz HR, et al. A neuronal acetylcholine receptor regulates the balance of muscle excitation and inhibition in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol.* 2009;7(12):e1000265.

Karczmar AG. Cholinesterases (ChEs) and the cholinergic system in ontogenesis and phylogenesis, and non-classical roles of cholinesterases - a review. *Chem Biol Interact.* 2010;187(1-3):34-43.

Karlovich CA, John RM, Ramirez L, Stainier DY, Myers RM. Characterization of the Huntington's disease (HD) gene homologue in the zebrafish *Danio rerio*. *Gene.* 1998;217(1-2):117-25.

Kawashima K, Fujii T. Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: overview of non-neuronal cholinergic systems and their biological significance. *J Pharmacol Sci.* 2008;106(2):167-73.

Kumar N, Jadhao SB, Chandan NK, Kumar K, Jha AK, Bhushan S, et al. Dietary choline, betaine and lecithin mitigates endosulfan-induced stress in *Labeo rohita* fingerlings. *Fish Physiol Biochem.* 2011. No prelo.

Lakshmana MK, Raju TR. Endosulfan induces small but significant changes in the levels of noradrenaline, dopamine and serotonin in the developing rat brain and deficits in the operant learning performance. *Toxicology.* 1994;91(2):139-50.

Li D, Liu J, Li J. Genotoxic evaluation of the insecticide endosulfan based on the induced GADD153-GFP reporter gene expression. *Environ Monit Assess.* 2011;176(1-4):251-8.

Liang A. Zebrafish--useful model for pharmacodynamics and toxicity screening of traditional Chinese medicine. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2009;34(22):2839-42.

Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet.* 2007;8(5):353-67.

Lukianova-Hleb EY, Santiago C, Wagner DS, Hafner JH, Lapotko DO. Generation and detection of plasmonic nanobubbles in zebrafish. *Nanotechnology.* 2010;21(22):225102.

Ly J, Shi R, Cai Y, Liu Y, Wang Z, Feng J, et al. Assessment of 20 organochlorine pesticides (OCPs) pollution in suburban soil in Tianjin, China. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2010;85(2):137-41.

Martins-Silva C, De Jaeger X, Guzman MS, Lima RD, Santos MS, Kushmerick C, et al. Novel strains of mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter: insights on transcriptional regulation and control of locomotor behavior. *PLoS One.* 2011;6(3):e17611.

Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen EG, Lockridge O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience.* 2002;110(4):627-39.

Mor F, Ozmen O. Endosulfan-induced neurotoxicity and serum acetylcholinesterase inhibition in rabbits: The protective effect of Vit C. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2010;96:4.

Moretto MB, Lermen CL, Morsch VM, Bohrer D, Ineu RP, da Silva AC, et al. Effect of subchronic treatment with mercury chloride on NTPDase, 5'-nucleotidase and acetylcholinesterase from cerebral cortex of rats. *J Trace Elem Med Biol.* 2004;17(4):255-60.

Moses V, Peter JV. Acute intentional toxicity: endosulfan and other organochlorines. *Clin Toxicol (Phila).* 2010;48(6):539-44.

Oda Y. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathol Int.* 1999;49(11):921-37.

Okay OS, Karacik B, Henkelmann B, Schramm KW. Distribution of organochlorine pesticides in sediments and mussels from the Istanbul Strait. *Environ Monit Assess.* 2011;176(1-4):14.

Oyekunle JA, Ogunfowokan AO, Torto N, Akanni MS. Determination of organochlorine pesticides in the agricultural soil of Oke-Osun farm settlement, Osogbo, Nigeria. *Environ Monit Assess.* 2011;177(1-4):51-61.

Park E, Lee Y, Kim Y, Lee CJ. Cholinergic modulation of neural activity in the telencephalon of the zebrafish. *Neurosci Lett*. 2008;439(1):79-83.

Paul V, Balasubramaniam E, Jayakumar AR, Kazi M. A sex-related difference in the neurobehavioral and hepatic effects following chronic endosulfan treatment in rats. *Eur J Pharmacol*. 1995;293(4):355-60.

Paul V, Balasubramaniam E, Kazi M. The neurobehavioural toxicity of endosulfan in rats: a serotonergic involvement in learning impairment. *Eur J Pharmacol*. 1994;270(1):1-7.

Paul V, Balasubramaniam E, Sheela S, Krishnamoorthy MS. Effects of endosulfan and aldrin on muscle coordination and conditioned avoidance response in rats. *Pharmacol Toxicol*. 1992;71(4):254-7.

Pereira TC, Rico EP, Rosemberg DB, Schirmer H, Dias RD, Souto AA, et al. Zebrafish as a model organism to evaluate drugs potentially able to modulate sirtuin expression. *Zebrafish*. 2011;8(1):9-16.

Peterson RT, Nass R, Boyd WA, Freedman JH, Dong K, Narahashi T. Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study. *Neurotoxicology*. 2008;29(3):546-55.

Pomés A, Rodríguez-Farré E, Suñol C. Disruption of GABA-dependent chloride flux by cyclodienes and hexachlorocyclohexanes in primary cultures of cortical neurons. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994;271(3):1616-23.

Rand GM, Carriger JF, Gardinali PR, Castro J. Endosulfan and its metabolite, endosulfan sulfate, in freshwater ecosystems of South Florida: a probabilistic aquatic ecological risk assessment. *Ecotoxicology*. 2010;19(5):879-900.

Rico EP, Rosemberg DB, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. *Toxicol Lett*. 2007;174(1-3):25-30.

Rocco L, Frenzilli G, Fusco D, Peluso C, Stingo V. Evaluation of zebrafish DNA integrity after exposure to pharmacological agents present in aquatic environments. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2010;73(7):1530-6.

Roex EW, Keijzers R, van Gestel CA. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquat Toxicol*. 2003;64(4):451-60.

Rubinstein AL. Zebrafish: from disease modeling to drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2003;6(2):218-23.

Seibt KJ, Oliveira RaL, Rico EP, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Typical and atypical antipsychotics alter acetylcholinesterase activity and ACHE expression in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2009;150(1):10-5.

Siebel AM, Rico EP, Capiotti KM, Piato AL, Cusinato CT, Franco TM, et al. *In vitro* effects of antiepileptic drugs on acetylcholinesterase and ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Toxicol In Vitro*. 2010;24(4):1279-84.

Sloman KA, Scott GR, Diao Z, Rouleau C, Wood CM, McDonald DG. Cadmium affects the social behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat Toxicol*. 2003;65(2):171-85.

Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2008;83(1):13-34.

Stanley KA, Curtis LR, Simonich SL, Tanguay RL. Endosulfan I and endosulfan sulfate disrupts zebrafish embryonic development. *Aquat Toxicol*. 2009;95(4):355-61.

Taylor MR, Hurley JB, Van Epps HA, Brockerhoff SE. A zebrafish model for pyruvate dehydrogenase deficiency: rescue of neurological dysfunction and embryonic lethality using a ketogenic diet. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(13):4584-9.

Taylor P, Brown JH. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 5 ed. New York: Raven Press; 1994. p. 231-60.

Tellez-Bañuelos MC, Santerre A, Casas-Solis J, Bravo-Cuellar A, Zaitseva G. Oxidative stress in macrophages from spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of endosulfan. *Fish Shellfish Immunol*. 2009;27(2):105-11.

Tellez-Bañuelos MC, Santerre A, Casas-Solis J, Zaitseva G. Endosulfan increases seric interleukin-2 like (IL-2L) factor and immunoglobulin M (IgM) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol*. 2010;28(2):401-5.

Trekels H, Van de Meutter F, Bervoets L, Stoks R. Species-specific responsiveness of four enzymes to endosulfan and predation risk questions their usefulness as general biomarkers. *Ecotoxicology*. 2012;21(1):268-79.

Ung CY, Lam SH, Hlaing MM, Winata CL, Korzh S, Mathavan S, et al. Mercury-induced hepatotoxicity in zebrafish: *in vivo* mechanistic insights from transcriptome analysis, phenotype anchoring and targeted gene expression validation. *BMC Genomics*. 2010;11:212.

Vale C, Fonfría E, Bujons J, Messeguer A, Rodríguez-Farré E, Suñol C. The organochlorine pesticides gamma-hexachlorocyclohexane (lindane), alpha-endosulfan and dieldrin differentially interact with GABA(A) and glycine-gated chloride channels in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuroscience*. 2003;117(2):397-403.

Van der Zee EA, Platt B, Riedel G. Acetylcholine: future research and perspectives. *Behav Brain Res*. 2011;221(2):583-6.

Van Dyk JS, Pletschke B. Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. *Chemosphere* 2011;82:291-307.

van Waarde A, Ramakrishnan NK, Rybczynska AA, Elsinga PH, Ishiwata K, Nijholt IM, et al. The cholinergic system, sigma-1 receptors and cognition. *Behav Brain Res*. 2011;221(2):543-54.

Velasco-Santamaría YM, Handy RD, Sloman KA. Endosulfan affects health variables in adult zebrafish (*Danio rerio*) and induces alterations in larvae development. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2011;153(4):372-80.

Weber J, Halsall CJ, Muir D, Teixeira C, Small J, Solomon K, et al. Endosulfan, a global pesticide: a review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic. *Sci Total Environ*. 2010;408(15):2966-84.

Wessler I, Kirkpatrick CJ. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol*. 2008;154(8):1558-71.

Willey JB, Krone PH. Effects of endosulfan and nonylphenol on the primordial germ cell population in pre-larval zebrafish embryos. *Aquat Toxicol*. 2001;54(1-2):113-23.

Yavuz Y, Yurumez Y, Kucuker H, Ela Y, Yuksel S. Two cases of acute endosulfan toxicity. *Clin Toxicol (Phila)* 2007;45:530-2.

Yen J, Donerly S, Levin ED, Linney EA. Differential acetylcholinesterase inhibition of chlorpyrifos, diazinon and parathion in larval zebrafish. *Neurotoxicol Teratol*. 2011;33(6):735-41.

Zhang F, Zhang Z, Thistle R, McKeen L, Hosoyama S, Toida T, et al. Structural characterization of glycosaminoglycans from zebrafish in different ages. *Glycoconj J*. 2009;26(2):211-8.

Zhou S, Dong Q, Li S, Guo J, Wang X, Zhu G. Developmental toxicity of cartap on zebrafish embryos. *Aquat Toxicol*. 2009;95(4):339-46.

Zon LI, Peterson RT. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(1):35-44.