

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

MARIANA BARBIERI DE AZEVEDO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ECTONUCLEOTIDASES EM RESPOSTA AOS
EFEITOS ADVERSOS CAUSADOS PELA EXPOSIÇÃO A 2,3,7,8-
TETRACLORODIBENZENO-*p*-DIOXINA (TCDD) UTILIZANDO *ZEBRAFISH* (*Danio
rerio*) COMO MODELO DE ESTUDO.**

Porto Alegre

2011

MARIANA BARBIERI DE AZEVEDO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ECTONUCLEOTIDASES EM RESPOSTA AOS
EFEITOS ADVERSOS CAUSADOS PELA EXPOSIÇÃO A 2,3,7,8-
TETRACLORODIBENZENO-*p*-DIOXINA (TCDD) UTILIZANDO *ZEBRAFISH* (*Danio
rerio*) COMO MODELO DE ESTUDO.**

Dissertação apresentada como requisito 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
2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar, aos meus pais Ana e Edson, que sempre me apoiaram e incentivaram desde a graduação até este momento. Amo vocês, incondicionalmente.

A minha irmã, Helena que mesmo longe, sempre esteve presente, me ouvindo e aconselhando. Agradeço também pelos momentos de descontração.

Ao meu orientador Dr. Maurício Bogo por confiar em mim e acreditar que eu era capaz. Agradeço de todo coração pelo apoio, confiança e ensinamentos que foram fundamentais para realização deste trabalho.

As minhas colegas de grupo, Luiza Kist, Rachel Fritsch e Vanessa Maynard que dedicaram parte do seu tempo para auxiliar na realização dos meus experimentos sempre com dedicação.

Aos demais colegas de laboratório que de alguma forma colaboraram com sábios ensinamentos. Muito obrigada!

RESUMO

A 2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-*p*-dioxina (TCDD) é membro de um grupo de contaminantes ambientais conhecido como hidrocarboneto aromático policlorinado e pode ser formada durante o processo de branqueamento com cloro, utilizado por fábrica de celulose e papel e como um subproduto da fabricação de determinados produtos químicos. Uma vez associado a ligantes como a TCDD, o receptor de hidrocarboneto arila (AHR) é translocado para o núcleo onde irá formar um dímero com o translocador nuclear do receptor hidrocarboneto arila (ARNT). O heterodímero AHR/ARNT formado regula a expressão de uma série de genes envolvidos na resposta celular a mudanças ambientais e a condições de desenvolvimento. Entre os genes, está o que codifica para NTPDase2 (previamente conhecida como ecto-ATPase). Com isso, torna-se importante avaliar a exposição aguda (*in vivo*) da TCDD sobre a hidrólise de ectonucleotidases em membranas cerebrais de *zebrafish*. As ectonucleotidases são enzimas capazes de hidrolisar os nucleotídeos e inativar a sinalização mediada pelos nucleotídeos extracelulares. Entre as ectonucleotidases, destacam-se as NTPDases e a ecto-5'-nucleotidase. A atividade de NTPDase demonstrou que não houve diferença significativa na hidrólise de ATP e de ADP, bem como de AMP em membranas cerebrais de *zebrafish*. Estas descobertas parecem ser importantes para reforçar a idéia de que a indução do gene que codifica à NTPDase2 pode não ser um fator geral da toxicidade de TCDD. No entanto, mais estudos utilizando doses mais elevadas de TCDD e exposição a longo prazo são necessárias.

Palavras chave: dioxina, TCDD, *zebrafish*, ectonucleotidases

ABSTRACT

The 2,3,7,8-tetrachlorodibenzeno-p-dioxin (TCDD) is a member of a group of environmental contaminants known as polychlorinated aromatic hydrocarbon and can be formed during the chlorine bleaching process used by pulp and paper and as a byproduct of the manufacture of certain chemicals. Once associated with ligands such as TCDD, the aryl hydrocarbon receptor (AHR) is translocated into the nucleus where it will form a dimer with nuclear translocator aryl hydrocarbon receptor (ARNT). The heterodimer AHR/ARNT formed, regulates the expression of a number of genes involved in cellular response to environmental changes and development conditions. Among the genes, is the coding for an ecto-ATPase (NTPDase2). Thus, it becomes important to assess the acute exposure (*in vivo*) of TCDD on the hydrolysis of ectonucleotidases in zebrafish brain membranes. The ectonucleotidases are enzymes capable of hydrolyzing the nucleotides and inactivating the signaling mediated by extracellular nucleotides. Among the ectonucleotidases, there are the NTPDase and ecto-5'-nucleotidase. The NTPDase activity showed no significant difference in the hydrolysis of ATP and ADP, as well as in AMP in membranes of zebrafish. These findings seem to be important to reinforce the idea that *NTPDase2* gene induction cannot be a general pathogenic factor in TCDD toxicity. However, further studies using either higher doses of TCDD and long-term exposure are required.

Keywords: dioxin, TCDD, zebrafish, ectonucleotidases

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP - adenosina 5' - difosfato

AHR - Receptor Hidrocarboneto Arila

AHREs – Elementos Regulatórios Responsivos a Hidrocarbonetos Aromáticos

AMP - adenosina 5' - monofosfato

ARNT – Translocador Nuclear do Receptor Hidrocarboneto Arila

ATP - adenosina 5' - trifosfato

NTPDases – Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases

PCBs – Bifenila Policlorinato

PCDDs – Dibenzeno-*p*- dioxinas

PCDFs – Dibenzeno furanos

TCDD – 2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-*p*-dioxina

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Zebrafish</i> (<i>Danio rerio</i>).....	9
Figura 2 – Estrutura química da 2,3,7,8-TCDD	11

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	9
1.1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1.1 <i>Zebrafish</i>	9
1.1.2 2,3,7,8-TCDD	10
1.1.3 TCDD e <i>Zebrafish</i>	11
1.1.4 Efeitos da exposição a TCDD	12
1.1.5 Sistema Purinérgico	14
1.1.6 Ectonucleotidasas	15
1.1.7 <i>Zebrafish</i> e Ectonucleotidasas	16
1.1.8 Ação da TCDD sobre o Sistema Nervoso de <i>zebrafish</i>	17
1.2. OBJETIVOS.....	18
1.2.1 Objetivo Geral	18
1.2.2 Objetivos Específicos	19
2. CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO	20
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXO (Comprovante de submissão do artigo)	45

1. CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Zebrafish

O *zebrafish* ou peixe-zebra é um pequeno teleósteo (3-4cm) de água doce, da família Cyprinidae, que vem sendo considerado um modelo ideal para estudos de numerosas doenças humanas (Sloman et al., 2003; Best and Alderton, 2008) (Figura 1).

Existem inúmeras vantagens para utilização de *zebrafish* (*Danio rerio*) como modelo para estudo experimental toxicológico (Spitsbergen e Kent, 2003), tais como: embriões claros o que o torna mais atrativo como modelo de estudo (Hill et al., 2005), capacidade de absorver rapidamente substâncias químicas diretamente da água, baixo custo, requer pouco espaço para manutenção, alta produção de embriões por ano e apresentam maturação sexual em quatro meses (Dodd et al., 2009). Além disso, este peixe combina a relevância de ser um vertebrado com a escala de estudo de um organismo invertebrado (Goldsmith, 2004; Hill et al., 2005).

O interesse pelo *zebrafish* pode ser observado pelo grande número de laboratórios que utilizam este teleósteo como modelo experimental em suas pesquisas e pelo crescimento exponencial do número de estudos publicados que envolvem esta espécie (Barbazuk et al., 2000; Carvan III et al., 2000; Sprague et al., 2001; Zon and Peterson, 2005; Lieschke and Currie, 2007; Gerlai et al., 2009).



Figura 1 - Zebrafish (*Danio rerio*).

Adaptado de: www.focusonnature.be/files/images/zebra.preview.jpg

1.1.2 2,3,7,8-TCDD

A 2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-*p*-dioxina (TCDD) (Figura 2) é membro de um grupo de contaminantes ambientais conhecido como hidrocarboneto aromático policlorinado, que inclui bifenila policlorinado (PCBs), dibenzenofuranos (PCDFs) e dibenzeno-*p*-dioxina (PCDDs) (Zodrow et al., 2004).

Esta dioxina pode ser formada durante o processo de branqueamento com cloro, utilizado por fábrica de celulose e papel e como um subproduto da fabricação de determinados produtos químicos. Além disso, ela é primeiramente lançada para o ambiente durante a combustão de combustíveis fósseis (incluindo veículos a motor) e madeira, bem como em processos de incineração (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)*, 1998).

A TCDD tem gerado preocupações devido a sua persistência e seu potencial toxicológico, e por ser difundida em concentrações crescentes, sendo encontrada em zonas aquáticas perto de centros urbanos (Van Metre et al., 2000; Borghesi et al., 2008).

Esta dioxina interfere no crescimento e diferenciação celular e, em consequência, promove um grande número de respostas adversas em animais de laboratório bem como em seres humanos (Poland e Knutson, 1982).

Os principais sintomas agudos a partir da exposição de seres humanos a níveis elevados de 2,3,7,8-TCDD no ar, estão relacionados com uma condição de acne severa que pode ser visível durante os primeiros meses de exposição. Estudos em humanos principalmente em trabalhadores expostos a 2,3,7,8-TCDD por inalação, encontraram uma associação entre a TCDD e câncer de pulmão, sarcomas de tecidos moles, linfomas e carcinomas do estômago (U.S. Environmental Protection Agency, 1997).



Figura 2 – Estrutura química da 2,3,7,8-TCDD

Adaptado de: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4f/Tcdd2378.png>

1.1.3 TCDD e *Zebrafish*

Os peixes estão entre os vertebrados que apresentam maior sensibilidade à toxicidade da TCDD, especialmente durante os primeiros estágios do desenvolvimento (Peterson et al., 1993). Por esta razão, nos últimos anos, o *zebrafish* tem-se tornado cada vez mais, um modelo atrativo para estudar os efeitos tóxicos gerados pela TCDD. Os sinais da toxicidade apresentados durante o desenvolvimento de *zebrafish* são essencialmente os mesmos encontrados em outras espécies de peixes e incluem: redução do fluxo sanguíneo, edema pericárdico, malformações craniofaciais, retardo no crescimento, edema no saco vitelínico, redução da capacidade cardíaca, anemia e desbalanço na bexiga natatória, seguida de morte (Henry et al., 1997; Belair et al., 2001, Teraoka et al., 2002; Zodrow et al., 2004).

Em estudo realizado por Bugiak e Weber (2009), foram injetados em *zebrafish* adultos, TCDD em concentração de 20µg/kg por animal (Zodrow e Tanguay, 2000; Zodrow et al., 2004). Esses animais foram observados durante 24 horas após a injeção e nenhuma morte havia ocorrido.

A utilização de *zebrafish* como modelo para estudo da toxicidade de TCDD foi essencial para identificar e caracterizar vias sinalizadoras de AHR, e hoje, muito se sabe sobre este composto (Prasch et al., 2003).

1.1.4 Efeitos da exposição a TCDD

A TCDD promove também uma toxicidade multisistêmica que inclui imunotoxicidade, cardiotoxicidade, toxicidade reprodutiva (Bugiak e Weber, 2009) e indução de enzimas envolvidas na metabolização de xenobióticos (Poland e Knutson, 1982; Safe, 1986). Muitos dos efeitos tóxicos e respostas adaptativas bioquímicas à TCDD apresentadas por diferentes espécies são mediadas pelo receptor hidrocarboneto arila (AHR) (Safe, 1986; Hahn et al., 1997).

Os efeitos de TCDD nos níveis de AHR são dependentes da dose, duração de exposição, tecido ou organismo estudado (Franc et al., 2001). Uma vez associado aos ligantes como a TCDD, o receptor citoplasmático AHR é translocado para o núcleo onde irá formar um dímero com o translocador nuclear do receptor hidrocarboneto arila (ARNT) (Zodrow et al., 2003, Jenny et al., 2009). O heterodímero AHR/ARNT formado irá interagir com os elementos regulatórios responsivos a hidrocarbonetos aromáticos (AHREs) regulando a expressão de uma série de genes envolvidos na resposta celular a mudanças ambientais e a condições de desenvolvimento (Gu et al., 2000).

Isoformas de AHR são designadas como AHR1 e AHR2 (Hahn et al., 1997). Dados provenientes da análise do padrão de expressão tecidual e da análise funcional sugerem que o receptor AHR2 seja responsável por mediar a toxicidade da TCDD durante o desenvolvimento de *zebrafish* (Andreasen et al., 2002). Em *zebrafish*, já foram identificados zfAHR1a, zfAHR1b e zfAHR2 (Tanguay et al., 1999; Andreasen et al., 2002; Karchner et al., 2005). Estudos em embriões de *zebrafish* sugerem que zfAHR2 e não zfAHR1 está envolvido com o desenvolvimento toxicológico de TCDD (Prasch et al., 2003). Quatro variantes de *zfARNT2* (*zfARNT2 a, b, c e x*) foram clonadas e caracterizadas (Mathew et al., 2005). Interessantemente, apenas a forma *ARNT2b* foi demonstrada por ser transcricionalmente ativa com o *AHR2* e capaz de formar um heterodímero funcional (AHR2/ARNT2b) *in vitro* (Tanguay et al., 2000).

Foi realizada a análise do padrão de expressão temporal e espacial de *AHR2* e *ARNT2* em embriões e adultos de *zebrafish*. A co-expressão de mRNA de *AHR2*, *ARNT2a* e *ARNT2b/c* foi identificada 24, 36, 48, 72 e 120 horas após a

fertilização (hpf), com ou sem indução pela TCDD, e em adultos, sem indução. Os transcritos foram identificados em diversos tecidos. Além disto, *AHR2* e *ARNT2* devem estar envolvidos no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso, já que seus transcritos estão também presentes no cérebro e órgãos sensoriais (Andreasen et al., 2002).

Além de *AHR2*, estudos mais recentes sugerem que outra proteína, a *AHR1B*, poderia responder eficientemente a TCDD e ativar genes alvo que estão sob controle de *AHR*, em *zebrafish* (Yin et al., 2008). Em um estudo realizado por Karchner *et al.* (2005), demonstrou-se que *AHR1B*, codifica uma proteína funcional *AHR*, expressa durante o desenvolvimento e, portanto, desempenha um papel fisiológico importante.

No núcleo, o complexo *AHR/ARNT* atua como um fator de transcrição que altera a expressão de diversos genes como *CYP1A1*, *CYP1A2* e *CYP1B1* (Witlock, 1999; Nebert et al., 2000).

Em um estudo realizado por Yin *et al.* (2008), foi sugerido que *CYP1B1* não está envolvido com o desenvolvimento toxicológico de dioxina em *zebrafish*.

O gene *CYP1A*, que codifica para o citocromo P4501A, é o mais bem caracterizado gene alvo para o dímero *AHR/ARNT*. O aumento da expressão de *CYP1A* por TCDD tem sido correlacionado com diversas respostas tóxicas durante o desenvolvimento de *zebrafish* e o citocromo P4501A postulado como mediador destas respostas (Andreasen et al., 2002; Dong et al., 2002; Teraoka et al., 2003; Zodrow et al., 2004). Entretanto, embora participe de algumas das repostas induzidas pela exposição à TCDD, foi demonstrado que o citocromo P4501A não representa o principal mediador à toxicidade da TCDD durante o desenvolvimento de *zebrafish*. Foi empregada a metodologia “oligonucleotídeos morfolino anti-senso” (são inibidores específicos da tradução – oligonucleotídeos complementares que se ligam a regiões específicas do mRNA e bloqueiam o acesso aos ribossomos) para impedir a expressão do citocromo P4501A em embriões de *zebrafish*. Embora a estratégia empregada tenha efetivamente impedido a síntese do citocromo P4501A, não ocorreu a prevenção de muitos dos efeitos finais da toxicidade à TCDD durante o desenvolvimento de *zebrafish*. Portanto, deve existir um modelo alternativo à ação do citocromo P4501A, no qual o heterodímero *AHR/ARNT* ativado por TCDD interfira

no processo normal de crescimento e desenvolvimento pela alteração do padrão de expressão gênica ou de função (Carney et al., 2004).

A partir da identificação inicial de que a toxicidade à TCDD é mediada pela ativação da via AHR/ARNT, tem sido demonstrado em diferentes sistemas celulares, a alteração da expressão de inúmeros genes envolvidos em diversas funções celulares. Em hepatomas de camundongos, foram estudados novos genes que podem responder à dioxina. Entre os genes de expressão alterada em resposta à TCDD, está o que codifica para uma ecto-ATPase (NTPDase2) em uma linhagem celular destes camundongos. O gene que codifica para a ecto-ATPase foi identificado empregando a estratégia de expressão diferencial (entre células controle e expostas à TCDD), clonado e caracterizado (Gao et al., 1998).

A idéia da indução de uma ecto-ATPase (NTPDase2) dá suporte ao conceito geral de que a TCDD pode produzir (parte) de seus efeitos biológicos adversos através da interferência na sinalização celular e rotas metabólicas críticas para a manutenção da homeostase (Gao et al., 1998).

1.1.5 Sistema Purinérgico

Os nucleotídeos constituem a mais representativa classe de substâncias sinalizadoras entre os seres vivos, promovendo respostas fisiológicas em efetivamente todos os tecidos. Nucleotídeos extracelulares modulam múltiplas funções teciduais, incluindo desenvolvimento, fluxo de sangue, secreção, inflamação e reações imunológicas (Zimmermann, 2001).

O ATP é uma importante molécula sinalizadora no espaço extracelular, desempenha importantes papéis em condições fisiológicas e patológicas (Zimmermann, 2001). Uma vez liberado no espaço extracelular, o ATP pode ser metabolizado pela ação de ectoenzimas que fazem a conversão deste nucleotídeo até adenosina (Zimmermann, 2001; Robson et al., 2006; Burnstock, 2009). O ATP e seus metabólitos, incluindo ADP e adenosina, afetam a neurotransmissão e neuromodulação, a agregação plaquetária, a contração cardíaca (Ralevic e Burnstock, 1998), o crescimento celular normal e anormal, a apoptose (Goepfert et

al., 2000), a sinalização intracelular (Schlosser et al., 1996), o desenvolvimento embrionário (Meyer et al., 1999) e a inflamação (Mariathasan et al., 2006).

Quatro membros da família NTPDase de mamíferos (NTPDase1, 2, 3 e 8) são firmemente ligados à membrana plasmática e responsáveis pela modulação dos níveis extracelulares dos nucleotídeos, podendo representar os alvos potenciais da ação tóxica de contaminantes na sinalização purinérgica. Na sinalização purinérgica, existe um eficiente mecanismo de inativação, no qual ATP, ADP e AMP são hidrolisados a adenosina por uma cascata enzimática constituída pela via das ectonucleotidases (Ribeiro e Sebastião, 2000).

1.1.6 Ectonucleotidases

As ectonucleotidases são enzimas capazes de hidrolisar os nucleotídeos e inativar a sinalização mediada pelos nucleotídeos extracelulares. Entre as ectonucleotidases, destacam-se as nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases) que hidrolisam nucleosídeos trifosfatados e difosfatados a seus equivalentes monofosfatados e fosfato inorgânico, e a ecto-5'-nucleotidase, que catalisa a hidrólise de nucleosídeos 5'-monofosfatados. Membros da família das NTPDases possuem cinco regiões conservadas características de apirase (ACR1-5), um ou dois domínios transmembrana e necessitam de cátions divalentes (Ca^{2+} ou Mg^{2+}) para sua atividade (Zimmermann, 2001). Esta família de enzimas é composta por oito membros, sendo que quatro das NTPDases estão localizadas na superfície das células, com um sítio catalítico extracelular (NTPDases1, 2, 3, 8), as NTPDases5 e 6 apresentam localização intracelular e as NTPDases4 e 7 são enzimas intracelulares cujos centros ativos estão direcionados para o lúmen das organelas citoplasmáticas (Zimmermann, 2001; Robson et al., 2006).

A NTPDase1 (CD39) hidrolisa tanto ATP quanto ADP da mesma maneira (1:1) enquanto que a NTPDase2 (CD39L1) tem afinidade por trifosfonucleosídeos (em uma razão de 30:1), motivo pelo qual é reconhecida como ecto-ATPase. A NTPDase3 (CD39L3, HB6) e a NTPDase8 preferem ATP em relação ao ADP em uma relação de 3:1 e de 2:1 respectivamente. Os outros membros da família

NTPDase são associados com membranas de organelas intracelulares (NTPDase4-7). A NTPDase4 (hLALP70) prefere UTP como substrato e está ancorada através de dois domínios transmembrana no Complexo de Golgi. A NTPDase5 (CD39L4) e a NTPDase6 (CD39L2) têm preferência por nucleosídeos difosfatados e possuem um único domínio transmembrana perto da porção N-terminal da proteína. A NTPDase5 está ligada ao retículo endoplasmático e a NTPDase6 ao Complexo de Golgi. A NTPDase7 (LALP1) prefere nucleosídeos trifosfatados como substrato e está localizada em vesículas extracelulares (Lavoie et al., 2004).

A ecto-5'-nucleotidase, também conhecida como a proteína linfocitária CD73 em associação à NTPDase, realiza a hidrólise do AMP até a produção de adenosina (Zimmermann, 1998). Em SNC, a ecto-5'-nucleotidase está predominantemente associada à glia, mas várias evidências têm demonstrado que esta atividade também está associada a neurônios (Zimmermann, 1996; Zimmermann et al., 1998; Zimmermann, 2001). A participação da ecto-5'-nucleotidase na via das ectonucleotidases exerce um papel modulador sobre a produção de adenosina extracelular, sendo a enzima marcapasso desta cascata enzimática (Zimmermann, 1996; Cunha, 2001).

1.1.7 *Zebrafish* e Ectonucleotidases

A linha de pesquisa intitulada “Ectonucleotidases e Sistema Purinérgico em Sistema Nervoso Central de *Zebrafish* (*Danio rerio*)” vem sendo desenvolvida na Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade do Rio Grande do Sul. Os projetos vinculados têm por objetivo a caracterização das atividades enzimáticas que participam na modulação dos níveis do ATP extracelular e sua utilização como um modelo de estudos farmacológicos e toxicológicos (por exemplo, como marcador biológico de contaminação aquática). Neste sentido, as atividades de hidrólise de ATP e ADP (Rico et al., 2003) e de AMP (Senger et al., 2004) foram caracterizadas em membranas cerebrais de *zebrafish*. A caracterização destas atividades enzimáticas tem permitido investigar a ação tóxica de diversos contaminantes ambientais sobre a neurotransmissão purinérgica nesta espécie, bem como, melhor

compreender o seu papel no sistema nervoso central. Desta forma, até o momento, foi avaliada toxicidade dos pesticidas Carbofuram e Malation (Senger et al., 2005), dos metais neurotóxicos zinco e cádmio (Senger et al., 2006a), do metanol (Rico et al., 2006) e do etanol (Rico et al., 2007), dos metais pesados mercúrio e chumbo (Senger et al., 2006b), além do cobre (Rosemberg et al., 2007).

Rico *et al* (2006), realizou uma análise filogenética com o objetivo de identificar genes ortólogos (de mesma função) no genoma de *zebrafish*. Quando as sequências deduzidas de aminoácidos das NTPDases1-3 e 8, tanto de *Homo sapiens* quanto de *Mus musculus*, foram utilizadas “como sequências de busca”, a ferramenta de procura “NCBI Blast Searches” teve como resultado quatro sequências “EST – Expressed Sequences Tag” completas de *zebrafish*. A análise filogenética demonstrou que uma delas é ortóloga a NTPDase1 (DrNTPDase1) e as outras três ortólogas a NTPDase2 (as parálogas DrNTPDase2_mg, DrNTPDase2_mq e DrNTPDase2_mv) de mamíferos. Em estudo recente, dez NTPDases ortólogas (NTPDase 1-6 e 8) foram caracterizadas em *zebrafish* através da análise filogenética. Um estudo anterior do mesmo laboratório já havia identificado a presença de três genes independentes entpd2 no *zebrafish* (entpd2_mg, entpd2_mq e entpd2_mv) (Rico et al., 2006). Porém, aqui, pela primeira vez, duas entpd5 (entpd5_ms e entpd5_me), entpd6 e entpd8 seqüências também foram identificados no genoma do *zebrafish* (Rosemberg et al., 2010). Foi verificado por RT-PCR (PCR em tempo real) a presença de atividade de NTPDase nos tecidos do *zebrafish* e identificação de membros distintos desta família de enzimas nesta espécie, no cérebro, fígado e coração (Rosemberg et al., 2010).

1.1.8 Ação da TCDD sobre o Sistema Nervoso de *zebrafish*

Foi mostrado, através da análise quantitativa de tecidos cerebrais de larvas de *zebrafish* expostas à TCDD, que ocorre uma redução substancial da capacidade de desenvolvimento embrionário do cérebro, causando uma deficiência de 30% do número total de neurônios em cérebros de larvas com 168 horas após a fertilização. Interessantemente, apesar do retardo do crescimento e da redução do número de

neurônios no cérebro, foi mostrado que a exposição à TCDD não afeta a estrutura de olhos e regiões cerebrais. Por esta razão, foi sugerido que a exposição à TCDD poderia levar primeiro à desorganização e enfraquecimento da transdução de sinal com perda de função cerebral e que, a perda do padrão neuronal poderia resultar no aumento da apoptose observada mais tarde no desenvolvimento (Hill et al., 2003).

Embora *zebrafish* adultos, no que diz respeito a malformações macroscópicas sejam consideravelmente menos sensíveis aos efeitos tóxicos da TCDD quando comparados aos estágios iniciais do desenvolvimento, foi mostrada a acumulação da dioxina (ao redor de 1% do total) após 20 dias, em cérebros de fêmeas adultas submetidas à exposição na dieta (Heiden et al., 2005). Se o acúmulo da TCDD e a exposição continuada induzirem persistentemente a atividade de hidrólise de ectoenzimas, sabidamente expressas em cérebro de *zebrafish*, as consequências da toxicidade poderiam, pelo menos em parte, ser causada pela mudança no metabolismo dos nucleotídeos.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar se a indução da(s) atividade(s) ectonucleotidásica(s) poderia(am) representar uma nova rota geral para as ações tóxicas da TCDD em sistema nervoso central utilizando *zebrafish* adultos como modelo de estudo.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a exposição aguda (*in vivo*) do TCDD (15 µg / kg de TCDD) sobre a hidrólise de ATP e ADP em membranas cerebrais de *zebrafish* adultos;

- Avaliar a exposição aguda (*in vivo*) do TCDD (15 µg / kg de TCDD) sobre a hidrólise de AMP em membranas cerebrais de *zebrafish* adultos;

2. CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO

2,3,7,8-Tetraclorodibenzeno-*p*-Dioxin (TCDD) acute exposure does not enhance ATP, ADP and AMP hydrolysis in adult zebrafish (*Danio rerio*) brain

Mariana Barbieri de Azevedo, Luiza Wilges Kist, Carlos Eduardo Leite, Vanessa Maynart Pereira, Rachel Seemann Fritsch, Stefânia Konrad Richetti, Andrei da Silveira Langoni, Carla Denise Bonan, Maurício Reis Bogo

(Artigo submetido ao Periódico Fish Physiology and Biochemistry)

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzeno-*p*-Dioxin (TCDD) acute exposure does not enhance ATP, ADP and AMP hydrolysis in adult zebrafish (*Danio rerio*) brain

Mariana Barbieri de Azevedo^a, Luiza Wilges Kist^a, Carlos Eduardo Leite^c, Vanessa Maynard Pereira^a, Rachel Seemann Fritsch^a, Stefânia Konrad Richetti^b, Andrei da Silveira Langoni^b, Carla Denise Bonan^{b,c,d}, Maurício Reis Bogo^{a,c,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 Instituto de Toxicologia, 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

*** Corresponding authors**

mbogo@pucrs.br (M. R. Bogo)

Tel.: +55 51 3353-4726

Fax: +55 51 3320-3568

ABSTRACT

The 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) is a member of a group of environmental contaminants known as polychlorinated aromatic hydrocarbon. The aryl hydrocarbon receptor (AHR) is a ligand-activated transcription factor that dimerizes with nuclear translocator aryl hydrocarbon receptor (ARNT) to mediate responses to TCDD. *CYP1A* gene, which encodes for cytochrome *P4501A*, is the most well characterized target gene for the heterodimer AHR/ARNT. The increased expression of *CYP1A* by TCDD has been correlated with several toxic responses and cytochrome P4501A postulated to mediate these responses. However, additional mechanisms are essential to elucidate the complete scenario of TCDD toxicity. It has been demonstrated previously that TCDD exposure causes the induction of *NTPDase2* gene in hepatomas of mice and suggested that TCDD produces part of their adverse biological effects by interfere in cell signaling. For this reason, the aim of this study was to evaluate ATP and ADP (induction of *NTPDase2*) and AMP hydrolysis in brain of adult zebrafish after TCDD acute exposure (*in vivo*). There were no significant changes in ATP, ADP and AMP hydrolysis in zebrafish brain membranes. These findings seem to be important to reinforce the idea that *NTPDase2* induction cannot be a general pathogenic factor in TCDD toxicity. However, further studies using either higher doses of TCDD and long-term exposure are required.

Keywords: dioxin, TCDD, zebrafish, ectonucleotidases, NTPDase2

Introduction

Popularly known as dioxin, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) is a member of a group of environmental contaminants known as polychlorinated aromatic hydrocarbon (Zodrow et al. 2004). This dioxin is a carcinogenic and teratogenic product emitted during combustion processes, chlorine bleaching (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) 1998) oil refining and can also be found in cigarettes (Planchart and Carolyn 2010).

Many of the toxic and biochemical adaptive responses to TCDD displayed by different species are mediated by the AHR (aryl hydrocarbon receptor) (Safe 1986; Hahn et al. 1997; Witlock 1999). Once associated with ligands such as TCDD, the AHR is translocated into the nucleus where it will form a heterodimer with nuclear translocator aryl hydrocarbon receptor (ARNT) (Zodrow and Tanguay 2003; Jenny et al. 2009). *CYP1A* gene, which encodes for cytochrome P4501A, is the most well characterized target gene for the heterodimer AHR/ARNT. The increased expression of *CYP1A* by TCDD has been correlated with several toxic responses and cytochrome P4501A postulated to mediate these responses (Andreasen et al. 2002; Dong et al. 2002; Teraoka et al. 2003; Zodrow et al. 2004).

Although studies on *CYP1A1* have revealed important aspects of dioxin action, additional mechanistic issues remain to be analyzed. For instance, in zebrafish embryos, MO-based knock-down of *CYP1A* does not prevent TCDD-induced developmental toxicity (Carney et al. 2004), suggesting that alternative mechanisms are responsible for toxicity. In this sense, the heterodimer AHR/ARNT changes the expression of numerous genes other than *CYP1A* which are involved in diverse cellular functions (Nebert et al., 2000) contributing to a greater effect on downstream toxicity (Volz et al. 2006).

Gao and colleagues (1998) using a differential expression strategy demonstrated the induction of an *NTPDase2* (previously known as ecto-ATPase) gene expression in mouse hepatoma cells after TCDD exposure. The idea of the induction of an *NTPDase2* gene supports the concept that TCDD produces part of their adverse biological effects by interfere in cell signaling and metabolic pathways critical for maintaining homeostasis (Gao et al. 1998). Take into account the diversity of extracellular nucleotide effects and their resemblances to some of the components of the TCDD toxicity syndrome, a role for disturbances in extracellular nucleotide signaling in TCDD toxicity is of substantial interest (Wood et al. 2002). The induction of *NTPDase2* gene represents an additional aspect of dioxin toxicity that is far to be completely understood.

ATP is an important signaling molecule in the extracellular space, plays important roles in physiological and pathological conditions (Zimmermann 2001). Once released into the extracellular space, the ATP can be metabolized by the action of ectoenzyme that make the conversion of this nucleotide to adenosine (Zimmermann 2001; Robson et al. 2006; Burnstock, 2009). The ATP and metabolites, including ADP and adenosine affect neurotransmission and neuromodulation, platelet aggregation, heart contraction (Ralevic and Burnstock 1998), the normal and abnormal cell growth, apoptosis (Goepfert et al. 2000) intracellular signaling (Schlosser et al. 1996), embryonic development (Meyer et al. 1999) and inflammation (Mariathasan et al. 2006).

NTPDases hydrolyze triphosphonucleosides and diphosphate with different abilities. The NTPDase1 (CD39) (Kaczmarek et al. 1996; Wang and Guidotti 1996) hydrolyzes ATP and ADP in the same way (1:1) while NTPDase2 (CD39L1) (Kegel et al. 1997; Mateo et al. 1999) prefers trifosfonucleosídeos (in a ratio of 30:1), that is why it knows as ecto-ATPase. The NTPDase3 (CD39L3, HB6) (Chadwick and Frischauf 1998; Smith and Kirley 1998) and NTPDase8 prefer ATP then ADP at a ratio of 3:1 and 2:1 respectively. Other members of the NTPDase family are associated with membranes of intracellular organelles (NTPDase4-7).

Fish are among the vertebrates that are more sensitive to the toxicity of TCDD (Peterson et al. 1993). The zebrafish (*Danio rerio*) is a small teleost widely used in toxicological and neurochemical studies (Rico et al. 2006; Castro et al. 2009; Richetti et al. 2011). This species combines the relevance of a vertebrate with the scalability of an invertebrate (Goldsmith 2004; Hill et al. 2005). For this reason, the zebrafish has also become an increasingly attractive model for study the toxic effects generated by the dioxins (Prasch et al. 2003; Teraoka et al. 2003; Mehta et al. 2008; Alexeyenko et al. 2010).

Considering that (i) TCDD causes a large number of apparently unrelated biological effects; (ii) the induction of an *NTPDase2* gene supports the concept that TCDD produces part of their adverse biological effects by interfering in cell signaling and (iii) zebrafish is a model widely used in toxicological and neurochemical studies from whom the NTPDase family genes were identified and their expression profiles in brain were determined (Rosemberg et al. 2010), the goal of this study was to investigate whether TCDD acute exposure (*in vivo*) was able to induce ATP and ADP hydrolysis hydrolysis (induction of *NTPDase2*) and AMP hydrolysis in brain of adult zebrafish aiming to contribute to better understand the complete scenario of TCDD toxicity.

Materials and Methods

Chemicals

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (0,001 ng/ μ L in toluene), toluene (Merck 99%), trizma base, malachite green, ammonium molybdate, polyvinyl alcohol, EDTA, EGTA, sodium citrate, Coomassie Blue G, bovine serum albumin, calcium chloride, magnesium chloride, and nucleotides (ATP, GTP, ADP, GDP, AMP, and GMP) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other reagents used were from analytical grade.

Zebrafish maintenance

Adult wild-type zebrafish (*Danio rerio*, Cyprinidae) of both sexes (3-6 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) and continuously aerated (7.20 mg O₂/L) at 26 \pm 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[®]. 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 10/00187-CEUA.

Animal procedures

After the adaptation phase, the fishes were weighed and those weighing between 0.7g – 0.9g were used for experiments. The fish were then transferred to 3-L aquarium in groups of five, where they remained for 24 hours for subsequent experiments. Intraperitoneal injections were conducted using a 3/10-mL U-100 BD Ultra-Fine™ Short Insulin Syringe 8 mm (5/16") \times 31G Short Needle (Becton Dickinson and Company, New Jersey, USA) according to the protocol established by Phelps et al. (2009). Briefly, each fish was weighed prior to the

intraperitoneal injection and the volume injected in each animal was adjusted to achieve the doses of toluene (vehicle) and TCDD (15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ according to Bugiak and Weber 2009). The animals of the control group received the same volume of saline solution. Anesthesia of the animals prior to the injection was obtained by its immersion in a solution of benzocaine (1 mM in MeOH 1%) until the animal showed a lack of motor coordination and reduced respiratory rate. The anesthetized animal was gently placed in a water-soaked gauze-wrapped hemostat with the abdomen facing up and the head of the fish positioned at the hinge of the hemostat (the pectoral fins were used as a landmark on the abdomen). The needle was inserted parallel to the spine in the midline of the abdomen posterior to the pectoral fins. The injection procedure was conducted in such a way as to guarantee that the animal did not spend more than 10 s out of the water. After the injection the animals were placed in a separate tank with highly aerated unchlorinated tap water (25 ± 2 °C) to facilitate recovery from the anesthesia. Saline solution was used as control. All the animals that recovered within 2-3 min following the injection continued in the experiment, while animals that did not recover during this period were discarded. One hour after the injection the animals were euthanized.

Membrane preparation

Brain membranes were prepared as described previously (Barnes et al. 1993). Zebrafish were cryoanaesthetized and euthanized by decapitation. Their brains were removed by dissection and briefly homogenized in 60 volumes (v/w) of chilled Tris-citrate buffer (50 mM Tris, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, pH 7.4, with citric acid) in a motor driven Teflon-glass homogenizer. The samples were centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min and the pellet was discarded. The supernatant was then centrifuged for 25 min at $40,000 \times g$. The resultant pellet was frozen in liquid nitrogen, thawed, resuspended in Tris-citrate buffer, and centrifuged for 20 min at $40,000 \times g$. This freeze-thaw-wash procedure was used to ensure the lysis of the brain membranes. The final pellet was resuspended and used in the enzyme assays. All samples were maintained at 2-4 °C throughout preparation.

Nucleotide hydrolysis assay

The conditions for the NTPDase and 5'-nucleotidase assays have been described previously (Rico et al. 2003 and Senger et al. 2004). Briefly, zebrafish brain membranes (3-5 μg protein) were added to the reaction

mixture containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 5 mM CaCl₂ (for NTPDase activity) or 50 mM Tris-HCl (pH 7.2) and 5 mM MgCl₂ (for ecto-5'-nucleotidase activity) in a final volume of 200 µL. The samples were preincubated for 10 min at 37 °C and the reaction was initiated by the addition of substrate (ATP, ADP, AMP) to a final concentration of 1 mM. The reactions were terminated after 30 min with the addition of 200 µL of 10% trichloroacetic acid and immediately placed on ice for 10 min. The inorganic phosphate (Pi) released was determined by colorimetric assay (Chan et al. 1986). To ensure that the concentration of Pi was within the linear range, aliquots of 13 and 50 µL were diluted to a final volume of 100 µL for assaying the ATP and ADP hydrolysis, respectively, whereas aliquots of 100 µL were performed for AMP substrate. Each sample was mixed to 250 µL of Malachite Green solution and the nucleotide hydrolysis was measured in a microplate reader at 630 nm after 20 min. Controls with the addition of the enzyme preparation after incubation period were used to correct non-enzymatic hydrolysis of substrates. Incubation times and protein concentrations were chosen to ensure the linearity of the reactions. The ectonucleotidase was expressed as nmol Pi min⁻¹ mg protein⁻¹ and nmol NH₃ min⁻¹ mg protein⁻¹, respectively. All enzyme assays run in duplicate of at least four independent experiments.

Protein determination

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

Statistical analysis

Data were expressed as means ± S.E.M. The activity of ectonucleotidases for each substrate (ATP, ADP and AMP) was assessed by analysis of variance one-way (one-way ANOVA), followed by Tukey test, where P<0.05 indicated significant difference.

Results

In this study, we verified the effects of acute TCDD exposure on ectonucleotidases (NTPDase and 5'-nucleotidase), responsible for regulating the extracellular concentrations of purine and pyrimidine nucleotides. To evaluate the *in vivo* effect of TCDD on ectonucleotidase activities, animals were intraperitoneally injected with saline solution, toluene or TCDD and the experiments have been performed one hour after. There were no significant changes in ATP (Fig. 1A), ADP when comparing toluene and TCDD (Fig. 1B) and AMP (Fig. 1C) hydrolysis after TCDD exposure. Thus, the ADP hydrolysis inhibition obtained was consequence of the vehicle used other than TCDD.

Discussion

The TCDD promotes a multisystem toxicity which includes wasting, edema, tumor promotion, cardiac contractile dysfunction, increased intracellular Ca^{+2} , disturbances in glucose metabolism, and immune system dysfunction (Poland and Knutson 1982; Canga et al. 1993). TCDD toxicity is mainly dependent on the AH receptor (Staples et al. 1998; Teraoka et al. 2003). Binding of TCDD by cytosolic AHR causes activation, nuclear translocation, and dimerization with aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT). Although the understanding of the mechanism of dioxin action is based largely upon studies of *CYP1A1* induction, the heterodimer AHR/ARNT also changes the expression of numerous genes which are involved in diverse cellular functions (Nebert et al. 2000).

Among others, an induction of the *NTPDase2* gene was identified in mouse hepatoma cells after TCDD exposure (Gao et al. 1998) suggesting a new pathway for TCDD actions where adverse biological effects through sustained disruptions of cellular signaling and metabolic pathways (critical for maintaining homeostasis) take place. More recently, controversial results dealing with *NTPDase2* gene induction as a consequence of the TCDD exposure were published. Wood and colleagues (2002) demonstrated that ectonucleotidase induction by TCDD is limited to *NTPDase2* gene and occurs in a cell-type specific manner (using cell cultures from different sources). Our results showed no significant changes in ATP, ADP and AMP hydrolysis in adult zebrafish brain membranes after TCDD acute exposure (*in vivo*) and reinforce the idea that *NTPDase2* induction cannot be a general pathogenic factor in TCDD toxicity. However, further studies using either higher doses of TCDD and long-term exposure are required.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (Proc. 1014500 - PqG and Proc. 10/0036-5 – PRONEX). M.B.A. and L.W.K. were recipients of fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). R.S.F., S.K.R. and A.L.S. were recipients of fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (1998) Toxicological Profile for Chlorinated Dibenzo-*p*-Dioxins. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA

Alexeyenko A, Wassenberg DM, Lobenhofer EK, Yen J, Linney E, Sonnhammer ELL (2010) Dynamic Zebrafish Interactome Reveals Transcriptional Mechanisms of Dioxin Toxicity. *PLoS One* 5(5):e10465.

Andreasen EA, Hahn ME, Heideman W, Peterson RE, Tanguay RL (2002) The zebrafish (*Danio rerio*) aryl hydrocarbon receptor type 1 (zfAHR1) is a novel vertebrate receptor. *Mol Pharmacol.* 62:234-249.

Barnes JM, Murphy PA, Kirkham D, Henley JM (1993) Interaction of guanine nucleotides with [3H]kainate and 6-[3H]cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione binding in goldfish brain. *J Neurochem* 61:1685–1691.

Bigonnesse F, Lévesque SA, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJ, Sévigny J (2004) Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry* 11;43(18):5511-9.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:218-254.

Bugiak B, Weber LP (2009) Hepatic and vascular mRNA expression in adult zebrafish (*Danio rerio*) following exposure to benzo-a-pyrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Aquatic Toxicology* 95:299-306.

Burnstock G (2009) Purinergic signalling: past, present and future. *Braz J Med Biol Res* 42(1):3-8.

Canga L, Paroli L, Blanck TJ, Silver RB, Rifkind AB (1993). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases cardiac myocyte intracellular calcium and progressively impairs ventricular contractile responses to isoproterenol and to calcium in chick embryo hearts. *Mol Pharmacol* 44:1142-1151.

Carney SA, Peterson RE, Heideman W (2004) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin activation of the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator pathway causes developmental toxicity through a CYP1A-independent mechanism in zebrafish. *Mol Pharmacol* 66:512-521.

Chadwick BP, Frischauf AM (1998) The CD39-like gene family—identification of three new human members (CD39L2, CD39L3, and CD39L4) their murine homologues, and a member of the gene family from *Drosophila melanogaster*. *Genomics* 50:357-67.

Chan KM, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157:375-380.

de Castro MR, Lima JV, de Freitas DP, Valente Rde S, Dummer NS, de Aguiar RB, dos Santos LC, Marins LF, Geracitano LA, Monserrat JM, Barros DM (2009) Behavioral and neurotoxic effects of arsenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*, Teleostei: Cyprinidae). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 150(3):337-42.

Dong W, Teraoka H, Yamazaki K, Tsukiyama S, Imani S, Imagawa T, Stegeman JJ, Peterson RE, Hiraga T (2002) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in the zebrafish embryo: local circulation failure in the dorsal midbrain is associated with increased apoptosis. *Toxicol Sci* 69(1):191-201.

Gao L, Dong L, Whitlock JP (1998) A Novel Response to Dioxin, Induction of ECTO-ATPase gene expression. *Mol Pharmacology* 273:15358-15365.

Goepfert C, Imai M, Brouard S, Csizmadia E, Kaczmarek K, Robson S (2000) CD39 modulates endothelial cell activation and apoptosis. *Mol Med* 6:591-603.

Goldsmith P (2004) Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol* 4(5): 504-512.

Hahn ME, Karchner SI, Shapiro MA, Perera SA (1997) Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94:13743-13748.

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

Jenny MJ, Karchner SI, Franks DG, Woodlin BR, Stegeman JJ, Hahn ME (2009) Distinct Roles of Two Zebrafish AHR Repressors (AHRRA and AHRRB) in Embryonic Development and Regulating the Response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Sci* 110(2):426-441.

Kaczmarek E, Koziak K, Se'vigny J, Siegel JB, Anrather J, Beaudoin AR, Bach FH, Robson SC (1996) Identification and characterization of CD39 vascular ATP diphosphohydrolase. *J Biol Chem* 271:33116-22.

Kegel B, Braun N, Heine P, Maliszewski CR, Zimmermann H (1997) An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacology* 36:1189-200.

Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440(7081):228-232.

Mateo J, Harden TK, Boyer JL (1999) Functional expression of a cDNA encoding a human ecto-ATPase. *Br J Pharmacol* 128:396-402.

Mehta V, Peterson RE, Heideman W (2008) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure prevents cardiac valve formation in developing zebrafish. *Toxicol Sci* 104(2):303-11.

Meyer MP, Clarke JD, Patel K, Townsend-Nicholson A, Burnstock G (1999) Selective expression of purinoceptor cP2Y1 suggests a role for nucleotide signalling in development of the chick embryo. *Dev Dyn* 214:152-158.

Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, SolisWA, Yang Y, Dalton T P (2000) Role of the aromatic hydrocarbon receptor [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 59:65-85.

Peterson RE, Theobald HM, Kimmel GL (1993) Developmental and reproductive toxicity of dioxin and related compounds: cross-species comparisons. *Crit Rev Toxicol* 32:283-335.

Phelps HA, Runft DL, Nelly MN (2009) Adult Zebrafish Model of Streptococcal Infection. *Curr. Protoc. Microbiol.* 13:9D.1.1-9D.1.27.

Planchart A, Mattingly CJ (2010) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin Upregulates FoxQ1b in Zebrafish Jaw Primordium. *Chem Res Toxicol.* 23(3):480-487.

Poland A, Knutson JC (1982) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22:517-554.

Prasch AL, Teraoka H, Carney SA, Dong W, Hiraga T, Stegeman JJ, Heideman W, Peterson RE (2003) Aryl hydrocarbon receptor 2 mediates 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin development toxicity in zebrafish. *Toxicol Sci* 76:138-150.

Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Ver.* 50(3):413-492

Richetti SK, Rosemberg DB, Ventura-Lima J, Monserrat JM, Bogo MR, Bonan CD (2011) Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *Neurotoxicology* 32:116-122.

Rico EP, Rosemberg DB, Senger MR, Arizi M de B, Bernardi GF, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD (2006) Methanol alters ecto-nucleotidases and acetylcholinesterase in zebrafish brain. *Neurotoxicol Teratol* 28:489-496.

Rico EP, Senger MR, Fauth MG, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD (2003) ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci* 73:2071-2082.

Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2:409-430.

Rosemberg DB, Rico EP, Langoni AS, Spinelli JT, Pereira TC, Dias RD, Souza DO, Bonan CD, Bogo MR (2010) NTPDase family in zebrafish: Nucleotide hydrolysis, molecular identification and gene expression profiles in brain, liver and heart. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 155(3):230-240.

Safe SH (1986) Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 26:371-399.

Schlosser SF, Burgstahler AD, Nathanson JA (1996) Isolated rat hepatocytes can signal to other hepatocytes and bile duct cells by release of nucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9948-9953.

Senger MR, Rico EP, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD (2004) Ecto-5'-nucleotidase activity in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 139:203-207.

Smith TM, Kirley TL (1998) Cloning, sequencing, and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. *Biochim Biophys Acta* 1386:65-78.

Staples JE, Murante FG, Fiore NC, Gasiewicz TA, Silverstone AE (1998) Thymic alterations induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are strictly dependent on aryl hydrocarbon receptor activation in hemopoietic cells. *J Immunol* 15;160(8):3844-54.

Teraoka H, Dong W, Iwasa H, Daiji E, Ueno N, Stegeman JJ, Peterson, R E, Hiraga, T (2003) Induction of cytochrome P450 1A is required for circulation failure and edema by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun* 304:223-228.

Volz DC, Hinton DE, Law JM, Kullman SW (2006) Dynamic Gene Expression Changes Precede Dioxin-Induced Liver Pathogenesis in Medaka Fish. *Toxicol Sci* 89(2):524-34.

Wang TF, Guidotti G (1996) CD39 is an ecto-(Ca²⁺, Mg²⁺)-ATPase. *J Biol Chem* 271:9898-901.

Witlock Jr JP (1999) Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:103-125.

Wood IG, Kelly PD, Chu F, Ngo-Hazelett P, Yan YL, Huang H, Postlethwait JH, Talbot WS (2002) A comparative map of the zebrafish genome. *Genome Res* 10:1903-1914.

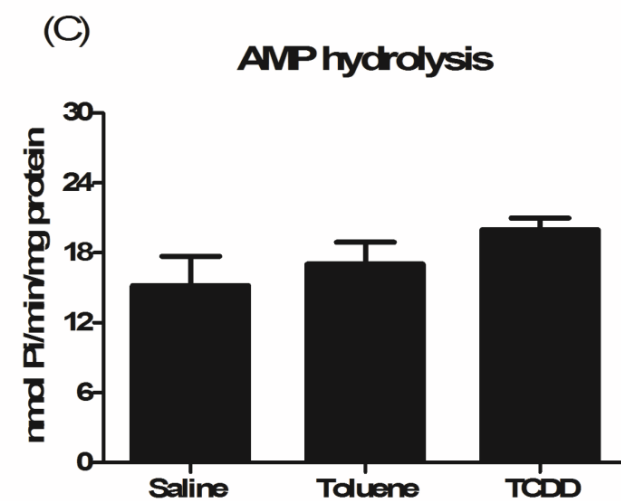
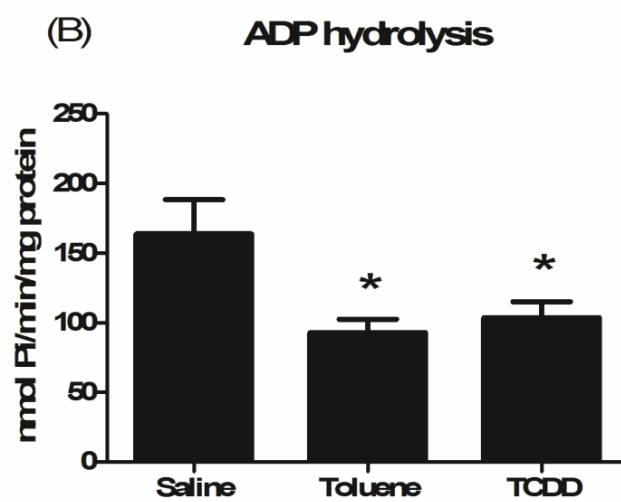
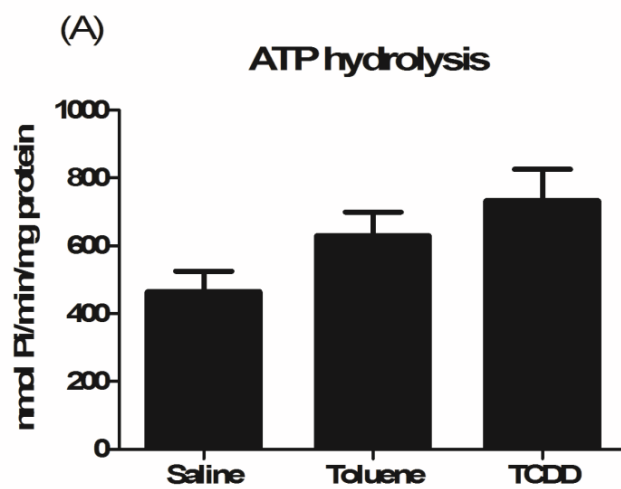
Zimmermann H (2001) Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res* 52:44-56.

Zodrow JM, Stegeman, JJ, Tanguay, RL (2004) Histological analysis of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in zebrafish. *Aquat Toxicol* 66:25-38.

Zodrow JM, Tanguay RL (2003) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin inhibits zebrafish caudal fin regeneration. *Toxicol Sci* 76:151-161.

Figure Legend

Figure 1: *In vivo* effect of acute treatment with TCDD (14 μ g/kg) on ATP hydrolysis (A), ADP hydrolysis (B) and AMP hydrolysis (C) in zebrafish brain membranes. Bars represent the mean \pm S.E.M. of at least three different experiments, each one performed in triplicate. The asterisk (*) indicates a significant difference when compared to the control group (one way ANOVA, followed by Tukey's test as post-hoc, $p < 0.05$). The specific enzyme activity is reported as nanomole of inorganic phosphate released per minute per milligram of protein.



3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Essa dioxina (TCDD) é um hidrocarboneto aromático policlorinado que modula o crescimento celular e diferenciação e, em consequência, promove um grande número de respostas adversas (Zodrow et al., 2004). Os sinais da toxicidade apresentados durante o desenvolvimento de *zebrafish* incluem: redução do fluxo sanguíneo, edema pericárdico, malformações craniofaciais, retardo no crescimento, edema no saco vitelínico, redução da capacidade cardíaca, anemia e desbalanço na bexiga natatória, seguida de morte (Henry et al., 1997; Belair et al., 2001, Teraoka et al., 2002; Zodrow, et al., 2004). A utilização de *zebrafish* como modelo para estudo da toxicidade de TCDD foi essencial para identificar e caracterizar vias sinalizadoras de AHR, e hoje, muito se sabe sobre este composto (Prasch et al., 2003).

Uma vez associado a ligantes como a TCDD, o receptor de hidrocarboneto arila (AHR) é translocado para o núcleo onde irá formar um dímero com o translocador nuclear do receptor hidrocarboneto arila (ARNT) (Zodrow et al., 2003, Jenny et al, 2009) O heterodímero AHR/ARNT formado regula a expressão de uma série de genes envolvidos na resposta celular a mudanças ambientais e a condições de desenvolvimento (Gu et al., 2000) Entre os genes, está o que codifica para NTPDase2 (previamente conhecida como ecto-ATPase). A idéia da indução de uma ecto-ATPase dá suporte ao conceito geral de que a TCDD pode produzir (parte) de seus efeitos biológicos adversos através de interferência na sinalização celular e rotas metabólicas críticas para a manutenção da homeostase (Gao et al., 1998).

No capítulo 2, foi testada a hipótese na qual a indução da atividade ectonucleotidástica poderia representar uma nova rota geral para as ações tóxicas da TCDD em sistema nervoso central utilizando *zebrafish* adultos como modelo de estudo. As ectonucleotidases são enzimas capazes de hidrolisar os nucleotídeos e inativar a sinalização mediada pelos nucleotídeos extracelulares. Entre as ectonucleotidases, destacam-se as nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases) e a ecto-5'-nucleotidase. A atividade de NTPDase e ecto-5'-nucleotidase, demonstrou que não houve uma diferença significativa na hidrólise de ATP e ADP e AMP em membranas cerebrais de *zebrafish*.

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que, nas condições testadas, a exposição a TCDD não induziu a atividade ectonucleotídica em membranas cerebrais de *zebrafish*.

Embora a TCDD seja um produto comercial (por exemplo, consta no catálogo da Empresa Sigma) e, portanto possa ser comprada, há uma série de limitações e restrições para o processo de comercialização. Apenas agentes/instituições credenciadas obtêm a licença necessária. Depois de muitos esforços e contatos, a TCDD foi obtida em uma concentração muito baixa (concentração padrão para aferição de equipamentos envolvidos no diagnóstico ambiental). Por esta razão, foi necessário implantar no laboratório uma metodologia de injeção intraperitoneal em adultos de *zebrafish*, previamente descrita na literatura (Phelps et al., 2009).

Estudos adicionais avaliando outras rotas de exposição, por exemplo, com a TCDD dissolvida na água e doses mais elevadas devem ser realizados. Adicionalmente, será importante avaliar a exposição crônica à dioxina para, de forma mais definitiva, refutar a hipótese testada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Chlorinated Dibenzo-p-Dioxins. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. 1998.

Andreasen EA, Hahn ME, Heideman W, Peterson RE, Tanguay RL. The zebrafish (*Danio rerio*) aryl hydrocarbon receptor type 1 (zfAHR1) is a novel vertebrate receptor. *Mol Pharmacol*. 2002;62:234-249.

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;10:1351-1358.

Belair CD, Peterson RE, Heideman W. Disruption of erythropoiesis by dioxin in the zebrafish. *Dev Dyn*. 2001;222:581-594.

Best JD, Alderton WK. Zebrafish: An *in vivo* model for the study of neurological diseases. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2008;4(3):567-576.

Borguesi N, Corsolini S, Focardi S. Levels of polybrominated diphenated diphenyl ethers (PBDEs) and organochlorine pollutants in two species of Antarctic fish. *Chemosphere*. 2008;73:155-160.

Bugiak B, Weber LP. Hepatic and vascular mRNA expression in adult zebrafish (*Danio rerio*) following exposure to benzo-a-pyrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Aquatic Toxicology*. 2009;13;95(4):299-306.

Burnstock G (2009) Purinergic signalling: past, present and future. *Braz J Med Biol Res* 42(1):3-8.

Carney SA, Peterson RE, Heideman W. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin activation of the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator pathway causes developmental toxicity through a CYP1A-independent mechanism in zebrafish. *Mol. Pharmacol*. 2004;66:512-521.

Carvan III MJ, Dalton TP, Stuart GW, Nebert DW. Transgenic zebrafish as sentinels for aquatic pollution. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;919:133-147.

Cunha RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem Int*. 2001;38(2):107-125.

Dodd A, Curtis PM, Williams LC, Love DR. Zebrafish: bridging the gap between development and disease. *Human Molecular Genetics*. 2009;9:2443-2449.

- Dong W, Teraoka H, Yamazaki K, Tsukiyama S, Imani S, Imagawa T, et al. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in the zebrafish embryo: local circulation failure in the dorsal midbrain is associated with increased apoptosis. *Toxicol Sci.* 2002;69(1):191-201.
- Franc MA, Pohjanvirta R, Tuomisto J, Okey AB. Persistent, Low-Dose 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin Exposure: Effect on Aryl Hydrocarbon Receptor Expression in a Dioxin-Resistance Model. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2001;175: 43-53.
- Gao L, Dong L, Whitlock JP. A Novel Response to Dioxin, Induction of ECTO-ATPase gene expression. *Mol Pharmacology.* 1998;273:15358-15365.
- Gerlai R, Chatterjee D, Pereira T, Sawashima T, Krishnannair R. Acute and chronic alcohol dose: population differences in behavior and neurochemistry of zebrafish. *Genes Brain Behav.* 2009;8(6):586-599.
- Goepfert C, Imai M, Brouard S, Csizmadia E, Kaczmarek K, Robson S. CD39 modulates endothelial cell activation and apoptosis. *Mol Med.* 2000;6:591-603.
- Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4(5):504-512.
- Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA. The PAS superfamily: Sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40:519-561.
- Hahn ME, Karchner SI, Shapiro MA, Perera SA. Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:13743-13748.
- Heiden TK, Hutz RJ, Carvan MJ. Accumulation, Tissue Distribution, and Maternal Transfer of Dietary 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: Impact on Reproductive Success of Zebrafish. *Toxicological Sciences.* 2005;87(2):497-507.
- Henry EC, Kent TA, Gasiewicz TA. DNA binding and transcriptional enhancement by purified TCDD. Ah receptor complex. *Arch Biochem Biophys.* 1997;339:305-314.
- Hill A, Howard CV, Strahle U, Cossins A. Neurodevelopmental defects in zebrafish (*Danio rerio*) at environmentally relevant dioxin (TCDD) concentrations. *Toxicol Sci.* 2003;76(2):392-399.
- Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci.* 2005;86(1):6-19.
- Jenny MJ, Karchner SI, Franks DG, Woodlin BR, Stegeman JJ, Hahn ME. Distinct Roles of Two Zebrafish AHR Repressors (AHRRA and AHRRb) in Embryonic Development and Regulating the Response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicological Science.* 2009;110(2):426-441.

Karchner SI, Franks DG, and Hahn ME. AHR1B, a new functional aryl hydrocarbon receptor in zebrafish: tandem arrangement of *ahr1b* and *ahr2* genes. *Biochem.* 2005;392:153-161.

Lavoie EG, Kukulski F, Levesque SA, Lecka J, Sevigny J. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-3. *Biochem Pharmacol.* 2004;67:1917-1926.

Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet.* 2007;8(5):353-367.

Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature.* 2006;440(7081):228-232.

Mathew LK, Andreasen EA, Tanguay RL. Aryl Hydrocarbon Receptor Activation Inhibits Regenerative Growth. *Mol Pharmacol.* 2005;69:257-265.

Meyer MP, Clarke JD, Patel K, Townsend-Nicholson A, Burnstock G. Selective expression of purinoceptor cP2Y1 suggests a role for nucleotide signalling in development of the chick embryo. *Dev Dyn.* 1999;214:152-158.

Nebert, DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y, Dalton TP. Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 2000;59:65-85.

Peterson RE, Theobald HM, Kimmel GL. Developmental and reproductive toxicity of dioxin and related compounds: cross-species comparisons. *Crit Rev Toxicol.* 1993;32:283-335.

Phelps HA, Runft DL, Nelly MN. Adult Zebrafish Model of Streptococcal Infection. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2009;13:9D.1.1-9D.1.27.

Poland A, Knutson JC. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: Examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1982;22: 517-554.

Prasch AL, Teraoka H, Carney SA, Dong W, Hiraga T, Stegeman JJ, et al. Aryl hydrocarbon receptor 2 mediates 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin development toxicity in zebrafish. *Toxicol Sci.* 2003;76:138-150.

Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Ver.* 1998;50(3):413-92.

Ribeiro JA, Sebastiao AM. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21(9):341-346.

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.

Rico EP, Rosemberg DB, Senger MR, Arizi MD, Bernardi GF, Dias RD, et al. Methanol alters ectonucleotidases and acetylcholinesterase in zebrafish brain. *Neurotoxicol Teratol.* 2006;28(4):489-496.

Rico EP, Senger MR, Fauth MG, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci.* 2003;73:2071-2082.

Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling.* 2006;2:409-430.

Rosemberg DB, Rico EP, Langoni AS, Spinelli JT, Pereira TC, Dias RD et al. The NTPDase family in zebrafish: Nucleotide hydrolysis, molecular identification and gene expression profile in brain, liver, and heart. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2010;155(3):230-240.

Rosemberg DB, Rico EP, Senger MR, Arizi MB, Dias RD, Bogo MR, et al. Acute and subchronic copper treatments alter extracellular nucleotide hydrolysis in zebrafish brain membranes. *Toxicology.* 2007;236(1-2):132-139.

Safe SH. Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1986;26:371-399.

Schlosser SF, Burgstahler AD, Nathanson JA. Isolated rat hepatocytes can signal to other hepatocytes and bile duct cells by release of nucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:9948-9953.

Senger MR, Rico EP, Arizi MD, Rosemberg DB, Dias RD, Bogo MR, et al. Carbofuran and Malathion inhibit nucleotide hydrolysis in zebrafish (*Danio rerio*) brain membranes. *Toxicology.* 2005;212:107-115.

Senger MR, Rico EP, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Ecto-5'-nucleotidase activity in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2004;139:203-207.

Senger MR, Rico EP, Arizi MD, Frazzom AP, Dias RD, Bogo MR, et al. Exposure to Hg²⁺ and Pb²⁺ changes NTPDase and ecto- 5'-nucleotidase activities in central nervous system of zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology.* 2006a;226(2-3):229-237.

Senger MR, Rosemberg DB, Rico EP, de Bem Arizi M, Dias RD, Bogo MR, et al. In vitro effect of zinc and cadmium on acetylcholinesterase and ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Toxicol. In Vitro.* 2006b;20(6):954-958.

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;65:171-185.

Sprague J, Doerry E, Douglas S, Westerfield M. The Zebrafish Information Network (ZFIN): a resource for genetic, genomic and developmental research. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(1):87-90.

Sptisbergen, JM, Kent ML. The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research-advantages and current limitation. *Toxicol Pathol*. 2003;31:62-87.

Tanguay RL, Abnet CC, Heideman W, and Peterson RE. Cloning and characterization of the zebrafish (*Danio rerio*) aryl hydrocarbon receptor. *Biochimica Biophys Acta* 1999;1444:35-48.

Tanguay RL, Andreasen EA, Heideman W, and Peterson RE. Identification and expression of alternatively spliced aryl hydrocarbon nuclear translocator 2 (ARNT2) cDNA from zebrafish with distinct functions. *Biochim Biophys Acta* 2000;1494:117-128.

Teraoka H, Dong W, Iwasa H, Daiji E, Ueno N, Stegeman JJ, et al. Induction of cytochrome P450 1A is required for circulation failure and edema by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzeno-p-dioxin in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;304:223-228.

Teraoka H, Dong W, Ogawa S, Tsukiyama S, Okuhara Y, Niiyama M, et al. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzeno-p-dioxin toxicity in the zebrafish embryo: Altered regional blood flow and impaired lower jaw development. *Toxicol Sci* 2002;65:192-199.

U.S. Environmental Protection Agency. Health Effects Assessment Summary Tables. FY 1997 Update. Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development, Cincinnati, OH. 1997.

Van Metre PC, Mahler BJ, Furlong ET. Urban sprawl leaves its PAH signature. *Environ Sci Technol*. 2000;34:4064-4070.

Witlock Jr JP. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39:103-125.

Yin Hou-Chu, Tseng HU, Chung HY, Ko CY, Tzou WS, Buhler DR, et al. Influence of TCDD on Zebrafish CYP1B1 Transcription during Development. *Toxic Science* 2008;103(1):158-168.

Zimmermann H. Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol*. 1996;49:589-618.

Zimmermann H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res* 2001;52:44-56.

Zimmermann H, Braun N, Kegel B, Heine P. New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. *Neurochem Int.* 1998;32(5-6):421-425.

Zodrow, J.M., Stegeman, J.J., and Tanguay, R.L. Histological analysis of acute toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzeno-p-dioxin (TCDD) in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 2004;66:25-38.

Zodrow J.M, Tanguay R.L. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzeno-p-dioxin inhibits zebrafish caudal fin regeneration. *Toxicol. Sci.* 2003;76, 151-161.

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

ANEXO (Comprovante de submissão do artigo)

Dear Dr Mauricio Bogo,

Thank you for submitting your manuscript, "2,3,7,8-Tetraclorodibenzeno-p-Dioxin (TCDD) acute exposure does not enhance ATP, ADP and AMP hydrolysis in adult zebrafish (*Danio rerio*) brain", to Fish Physiology and Biochemistry

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<http://fish.edmgr.com/>

If your manuscript is accepted for publication in Fish Physiology and Biochemistry, you may elect to submit it to the Open Choice program. For information about the Open Choice program, please access the following URL: <http://www.springer.com/openchoice>

Thank you very much.

With kind regards,

Journals Editorial Office FISH
Springer
P.O. Box 990
3300 AZ DORDRECHT
The Netherlands
Fax: +31 78 657 6555