

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

GIOVANNA MEDEIROS TAVARES DE OLIVEIRA

**MODULAÇÃO DA NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA
COMO RESPOSTA AOS EFEITOS CAUSADOS PELA EXPOSIÇÃO
A NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO REVESTIDAS COM
DEXTRAN-AMINADO UTILIZANDO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)
COMO MODELO DE ESTUDO**

Prof. Dr. Maurício Reis Bogo

Orientador

PORTO ALEGRE

2013

GIOVANNA MEDEIROS TAVARES DE OLIVEIRA

**MODULAÇÃO DA NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA COMO
RESPOSTA AOS EFEITOS CAUSADOS PELA EXPOSIÇÃO A NANOPARTÍCULAS
DE ÓXIDO DE FERRO REVESTIDAS COM DEXTRAN-AMINADO UTILIZANDO
ZEBRAFISH (*Danio rerio*) COMO MODELO DE ESTUDO**

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

Orientador

Prof. Dr. Maurício Reis Bogo

Porto Alegre, RS

2013

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, à minha família, em especial aos meus pais Paulo Roberto e Maria Inês e minha irmã Bruna, pela atenção e carinho. Obrigada pela compreensão, ao serem privados em muitos momentos da minha companhia, e pelo apoio, me estimulando nos momentos mais difíceis. Minha gratidão especial ao professor Doutor Maurício Reis Bogo, meu orientador, por ter depositado sua confiança em mim ao longo desses anos, desde a graduação. Sem sua orientação e apoio durante esses anos, nada disso seria possível. Um obrigada especial às colegas Talita Pereira e Luiza Kirst, que se tornaram mais do que colegas, mas companheiras e tutoras. Que durante todo o percurso me auxiliaram e tornaram possível o meu crescimento como pesquisadora, principalmente a Talita Pereira que me acolheu como “pupila” desde os primeiros momentos, sempre disposta a ajudar. Ainda sobre os colegas de trabalho, agradeço a todos do Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, pela ajuda em momentos de dúvida, pelos ensinamentos e pela amizade. Inclusive aos colegas que não mais se encontram no laboratório, mas que fizeram parte da minha caminhada, como Cladinara Roberts Sarturi, Priscilla Zamberlan e Arethuzza Dornelles. Agradeço, também, aos meus amigos, principalmente Luelen Krashefski e Gisele Giongo. Obrigada pela amizade, disposição e por sempre torcerem por mim, independente da distância. Por fim, agradeço aos professores Ricardo Papaléu e Nara Regina Basso, colaboradores do projeto de mestrado, pela confiança e pela orientação. As discussões e ensinamentos acerca de Nanopartículas acrescentaram muito a este trabalho.

RESUMO

Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs) são de grande interesse na nanomedicina, devido à sua capacidade para agir, simultaneamente, como um agente de contraste em imagem por ressonância magnética e como um sistema de entrega de fármacos específicos, possuindo boa biocompatibilidade. Atualmente, uma das maiores preocupações com a utilização de SPIONs permanece em torno da sua toxicidade e, por esta razão, é importante estabelecer um limite de segurança para sua utilização. Neste estudo, SPIONs revestidas com dextran-aminado (CLIO-NH₂) foram sintetizados pelo método de coprecipitação e caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e dinâmica de espalhamento de luz. A análise da composição elementar da solução no final da síntese foi também realizada. O tamanho do núcleo de magnetite foi de $5,5 \pm 1,4$ nm, com uma concentração de 10 mg Fe-NPs/ml. Foram avaliados o efeito de diferentes doses de CLIO-NH₂ (20, 50, 100, 140 e 200 mg/kg), após a exposição de CLIO-NH₂ (em uma, 16, 24 e 48 h), sobre a atividade de AChE e sobre a expressão de *ache* em cérebro de peixe-zebra. Nas concentrações testadas, apenas os animais expostos a 200 mg/kg, testados 24 h após a administração das nanopartículas, demonstraram diminuição da atividade da AChE. Quarenta e oito horas após exposição a CLIO-NH₂ os valores voltaram aos níveis controle, indicando um efeito tóxico transitório. Os resultados de RT-qPCR sugerem que a inibição da AChE no cérebro não está diretamente relacionada com o controle da transcrição e que esta relacionada com a modulação de eventos pós-transcricionais. Uma vez que a ACh é reconhecida por desempenhar um papel importante na regulação do controle locomotor, foram avaliados parâmetros da atividade da natação do peixe-zebra. CLIO-NH₂, à 200 mg/kg, após 24 h de tratamento, também prejudicou todos os parâmetros testados de comportamento de nado, ocorrendo diminuição da distância percorrida, velocidade, número de cruzamentos de linha e ângulo de virada. Ainda foi analisado o acúmulo de ferro no cérebro de peixe-zebra, por ICP-

MS, onde um nível significativamente maior de ferro férrico foi encontrado nos cérebros de peixe-zebra expostos a CLIO-NH₂ nas mesmas condições experimentais (200 mg/kg e 24 h de exposição). Concluindo, os resultados apresentados fornecem evidências de que doses elevadas de nanopartículas de óxido de ferro, revestidas com dextran-aminado, podem produzir neurotoxicidade transitória, coincidente com níveis cerebrais elevados de ferro, bem como as alterações comportamentais.

Palavras chave

Nanopartículas; SPIONs; CLIO-NH₂; AChE; Neurotoxicidade; Zebrafish.

ABSTRACT

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) are of great interest in nanomedicine due to their capability to act simultaneously as a contrast agent in magnetic resonance imaging and as a targeted drug delivery system with good biocompatibility. At present, one of the biggest concerns about the use of SPIONs remains around its toxicity. For this reason, it is important to establish the safe upper limit for each use. In the present study, SPION coated with cross-linked and aminated dextran (CLIO-NH₂) were synthesized by the co-precipitation method and characterized by transmission electron microscopy (TEM) and light scattering dynamics. The analysis of the elementary composition of the solution at the end of the synthesis was also performed. The magnetite core size was 5.5 ± 1.4 nm, on a concentration of 10 mg Fe-NPs/ml. We have evaluated the effects of different CLIO-NH₂ doses (20, 50, 100, 140 and 200 mg/kg) as a function of time after exposure (one, 16, 24 and 48 hours) on AChE activity and *ache* expression in zebrafish brain. At tested concentrations, only the animals exposed to 200 mg/kg, and assessed 24 h after administration of the nanoparticles, have shown decreased AChE activity. These values returned to control levels after 48 h of exposition, indicating a transitory toxic effect. The RT-qPCR results suggested that inhibition of brain AChE is not directly related with the transcriptional control, and it was probably due to post-transcriptional events. Once ACh is recognized to play an important role in the regulation of locomotor control, we further evaluated parameters of zebrafish swimming activity. CLIO-NH₂ at 200mg/kg, evaluated after 24 h, also impaired all the tested parameters of zebrafish swimming activity, i.e. decreased traveled distance, mean speed, number of line crossings, and turn angle. We further investigated the iron accumulation in zebrafish brain by ICP-MS, and a significant higher level of ferric iron was found in zebrafish brains exposed to CLIO-NH₂. In summary, the results presented herein provide further

experimental evidence that exposure to high doses of dextran-coated iron oxide nanoparticles can be transiently neurotoxic.

Keywords

Nanoparticles; SPIONs; CLIO-NH₂; AChE; Neurotoxicity; Zebrafish.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Zebrafish (<i>Danio rerio</i>). Retirado do banco de dados ZFIN (http://zfin.org).	16
Figura 2 Processo de síntese, degradação e transporte em um terminal pré-sináptico colinérgico. Retirado de Siegel et al., 2006.....	20
Figura 3 Estrutura do receptor nicotínico. Pode-se perceber as cinco subunidades arranjadas ao redor de uma cavidade central permitindo a passagem de cátions. Retirado de Ventura et al., 2010.	22
Figura 4 Receptor colinérgico muscarínico mostrando os sete domínios transmembrana e a alça de ligação à proteína G. Em detalhe, parte da sequência de aminoácidos dessa alça revelando a homologia entre as classes de receptores. Retirado de Ventura et al., 2010. 23	23
Figura 5 Exemplos dos mecanismos de estabilização da superfície de nanopartículas magnéticas. (a) estabilização eletrostática e (b) estabilização estérica. Retirado de Júnior, 2011.	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Materiais utilizados como revestimento de nanopartículas metálicas para sua estabilização. Retirado de Gupta & Gupta, 2005.	31
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil CoA - acetil coenzima A

ACh - acetilcolina

AChE – acetilcolinesterase

BuChE - butirilcolinesterase

Ca²⁺ - cálcio

cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar

ChAT – colina acetil transferase

ChT – transportador de colina

CLIO-NH₂ - nanopartículas de óxido de ferro dextran-aminadas

DAG - diacilglicerol

GABA - ácido γ -amino butírico

K⁺ - potássio

Mg²⁺ - magnésio

MNPs - *Magnetic nanoparticles* (nanopartículas magnéticas)

Na⁺ - sódio

NP - nanopartícula

nAChR – receptores nicotínicos

PEG – polietilenoglicol

PCR - *polymerase chain reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PVP - polivinilpirrolidona

PVA - álcool polivinil

RNA - ácido ribonucleico

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Periférico

SPION – Nanopartícula superparamagnética de óxido de ferro

UV – ultravioleta

VAChT – transportador vesicular de acetilcolina

ZFIN - *Zebrafish Information Network* (Rede Internacional de Dados do *Zebrafish*)

SUMÁRIO

Agradecimentos	3
Resumo	4
Abstract	6
Lista de ilustrações	8
Lista de tabelas	9
Lista de abreviaturas	10
Sumário	12
Capítulo I	14
1 Introdução.....	15
1.1 Zebrafish	15
1.2 Sistema colinérgico.....	19
1.2.1 Síntese, armazenamento e liberação de Ach	20
1.2.2 Receptores	21
1.2.3 Acetilcolinesterase (AChE).....	23
1.3 Nanopartículas de óxido de ferro.....	26
1.3.1 Metabolização e excreção de NPs.....	33
2 Objetivos	36
2.1 Objetivo Geral.....	36
2.2 Objetivos específicos	36
3 Local de execução	37
Capítulo II.....	38
Capítulo III.....	72
4 discussão e perspectivas	73
5 Bibliografia.....	75

ANEXO I.....99

ANEXO II.....100

CAPÍTULO I

1	Introdução	15
1.1	Zebrafish	15
1.2	Sistema colinérgico	19
1.2.1	Síntese, armazenamento e liberação de Ach.....	20
1.2.2	Receptores	21
1.2.3	Acetilcolinesterase (AChE)	24
1.3	Nanopartículas de óxido de ferro	26
1.3.1	Metabolização e excreção de NPs	33
2	Objetivos	36
3	Local de execução	37

1 INTRODUÇÃO

1.1 ZEBRAFISH

O zebrafish (*Danio rerio*) é um pequeno teleósteo (3-5 cm) tropical de água doce, muito conhecido como peixe ornamental (Figura 1). O primeiro cientista a estudar esta espécie foi George Streisinger, que aplicou as técnicas de análise mutacional para estudar o desenvolvimento embrionário deste modelo. As características encontradas pelo pesquisador, no final dos anos 60, que conferem vantagem ao zebrafish como animal modelo, continuam como pré-requisitos até hoje. São elas: alta taxa de reprodução em laboratório, fecundação externa com gametas que podem ser colhidos separadamente e embriões translúcidos, tornando viável a observação de todo o processo de desenvolvimento do animal pelo cientista (Grunwald & Eisen, 2002). Além destas, o zebrafish possui outras características que corroboram sua utilização como animal modelo: pequeno tamanho, o que torna fácil de manter um grande grupo em um espaço relativamente pequeno; rápido desenvolvimento (em aproximadamente cinco dias as larvas já conseguem nadar e auto alimentar-se); geram grande número de descendentes, quando mantidos sobre condições de fotoperíodo e alimentação apropriados; comportamento inato e relacionado à exposição de drogas pode ser facilmente identificado e quantificado em um ambiente isolado, além de possuir alto grau de similaridade de genes com camundongos e humanos (Lele & Krone, 1996; Barbazuk et al., 2000; Westerfield, 2000; Guo et al., 2004; Lieschke & Currie, 2007).

Nos últimos anos, estudos com zebrafish descreveram centenas de mutações que perturbam processos básicos de desenvolvimento, incluindo aquelas que alteram a forma do embrião, a formação das camadas germinativas, a organização de regiões distintas do cérebro e arquitetura vascular e o estabelecimento definitivo de circuitos neurais. Estes resultados abriram portas para novos campos de estudos com zebrafish e, atualmente, ele é utilizado em diversas áreas da ciência, incluindo: genética e genômica, biologia do desenvolvimento,

neurobiologia, teratologia, comportamento e toxicologia (Lele & Krone, 1996; Vascotto et al., 1997; Grunwald & Eisen, 2002; Gerlai, 2003; Norton & Bally-Cuif, 2010; Rico et al., 2011).



Figura 1 Zebrafish (*Danio rerio*). Retirado do banco de dados ZFIN (<http://zfin.org>).

A partir dos anos 2000, o interesse por essa espécie aumentou, fato que pode ser observado pelo crescente número de publicações ao longo do tempo utilizando zebrafish como modelo de estudo (Sprague, 2001; Hill et al., 2005). Dentro destes estudos se destacam: o sequenciamento do genoma total feito pelo Instituto Sanger, o sequenciamento do genoma mitocondrial, feito por Broughton e colaboradores, a documentação de um manual de manutenção e controle das condições em laboratório feito por Westerfield e uma revisão acerca de sua ecologia e comportamento feito por Spence e colaboradores (Broughton et al., 2001; Stern & Zon, 2003; Spence et al, 2008; Woods et al., 2000). Todas as informações genéticas, de comportamento e desenvolvimento desse animal foram compiladas em um banco de dados online chamado “The Zebrafish Information Network” (ZFIN), onde também se encontram publicações e recursos que auxiliam o estudo deste modelo (Sprague et al., 2008).

Dados provenientes de pesquisas com zebrafish podem servir como um complemento para o projeto do genoma humano, tendo em vista que vários genes de função conhecida em zebrafish possuem análogos em humanos (Dooley & Zon, 2000). Genes relacionados ao câncer (oncogenes) (Amatruda et al., 2002; Stern & Zon, 2003), genes de destino celular (Hox clusters) (Amores et al., 1998) e genes relacionados a enfermidades cardiovasculares,

hematopoiéticas e renais (Dood et al., 2000; Dooley et al., 2000) já foram identificados neste modelo. Além disso, estes estudos mostraram que neoplasias e fenótipos mutantes em zebrafish possuem semelhanças histológicas e genéticas a doenças humanas.

Zebrafish possui dois pares de cromossomos a mais do que os 23 pares de cromossomos humanos. Isso ocorre porque em algum momento da evolução dos teleósteos ocorreu um evento de duplicação total do genoma (Hill et al., 2005). A importância dessa descoberta é que, enquanto uma mutação em um mamífero pode causar letalidade para o embrião, a mesma mutação em um gene ortólogo de zebrafish pode mostrar menor severidade no fenótipo com o embrião ainda viável, permitindo a análise do gene em zebrafish que seria difícil de realizar em mamíferos, devido à associação deste gene com alta mortalidade (Postlethwait & Westerfield, 1998; Barbazuk et al., 2000; Hill et al., 2005).

Atualmente, o zebrafish é considerado o principal modelo experimental para o estudo de desenvolvimento de vertebrados devido à sua característica de ovos translúcidos e rápido desenvolvimento (Anderson & Inghan, 2003). Graças a esse fato, as características de sua embriogênese são bem conhecidas, assim como o destino celular durante seu desenvolvimento (Kimmel & Warga, 1988; Kimmel, 1989; Warga & Kimmel, 1990; Kimmel et al., 1995; Lele & Krone, 1996).

Devido ao seu pequeno tamanho e à capacidade de absorver rapidamente compostos que são adicionados na água e acumulá-los em diferentes tecidos (principalmente no sistema nervoso central), o zebrafish tornou-se alvo de diversas pesquisas farmacológicas e toxicológicas (Lele & Krone, 1996; Airhart et al., 2007; Parng et al., 2007; Rico et al., 2011). Já existem relatos da exposição deste a pesticidas carbanatos e organofosforados (Senger et al., 2005), a 2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina (TCDD) (Dong et al., 2002; Hill et al., 2003), ao metanol (Rico et al., 2006), ao etanol (Rico et al., 2007; Rico et al., 2008) e a metais pesados (Senger et al., 2006a; Rosemberg et al., 2007; Richetti et al., 2011).

O zebrafish, portanto, tem sido utilizado em testes toxicológicos de compostos e pequenas moléculas, como ponto de partida para a produção de novas drogas, sendo considerado um modelo para análise de transcriptoma, proteoma e metaboloma (Parng et al., 2002; Santos et al., 2010; Sukardi et al., 2010).

O aumento no conhecimento sobre sistemas neurotransmissores em zebrafish e o esclarecimento sobre os seus aspectos farmacológicos e toxicológicos permitiram sua utilização em estudos de toxicidade (Rico et al., 2011). Diferentes sistemas de neurotransmissão já foram identificados nesta espécie tais como: glutamatérgico (Edwards and Michel, 2002; Tabor and Friedrich, 2008), colinérgico (Behra et al., 2002; Clemente et al., 2004; Arenzana et al., 2005; Senger et al., 2006b; Edwards et al., 2007), dopaminérgico (Boehmler et al., 2004; Ryu et al., 2006; Russek-Blum et al., 2008), serotoninérgico (Rink & Guo, 2004; Lillesaar et al., 2007; Norton et al. 2008), histaminérgico (Kaslin & Panula, 2001), gabaérgico (Kim et al., 2004; Delgado & Schmachtenberg, 2008) e purinérgico (Rico et al., 2003; Senger et al., 2004; Low et al., 2008).

Estudos comportamentais utilizando zebrafish têm aumentado nesses últimos anos. A genética molecular, em conjunto com análise de comportamento, têm identificado mecanismos relacionados à neuropatogênese e aos genes envolvidos na formação de circuitos neuronais e na execução de comportamento. A análise destes genes tem o potencial de fornecer importantes conhecimentos sobre a relação destes com circuitos neuronais e comportamentos em estado normal e patológico (Vascotto et al., 1997; Guo et al., 2004). Já foram descritos comportamentos de coesão de grupo (Miller & Gerlay, 2007), agressividade (Gerlay, 2003), aprendizado, memória e mecanismo de recompensa (Colwill et al., 2005; Norton & Balley-cuif, 2010), além de preferência por ambientes claros e escuros (Serra et al., 1999). Para avaliar as mudanças comportamentais deste teleósteo, um grande número de estudos está sendo desenvolvido (Gerlai et al., 2000; Guo, 2004; Blaser & Gerlay, 2006;

Emran et al., 2008; Spence et al., 2008). Tendo em vista que a análise de comportamento já foi utilizada para avaliar o efeito de pesticidas, drogas e xenobióticos em zebrafish (Levin & Swain, 2004; Levin & Chen, 2004; Swain et al., 2004), testes semelhantes devem ser incluídos em estudos que busquem elucidar o efeito de compostos e moléculas no cérebro deste modelo.

1.2 SISTEMA COLINÉRGICO

Os neurônios colinérgicos inervam a musculatura voluntária do sistema somático e também são encontrados no Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Periférico (SNP) (Soreq & Seidman, 2001). No zebrafish, a identificação de neurônios colinérgicos no SNC foi reportada utilizando anticorpos contra Colina-acetil Transferase (ChAT) (Clemente et al., 2004; Kaslin et al., 2004; Mueller et al., 2004) apresentando imunoreatividade positiva no telencéfalo ventral (Muller et al., 2004; Kaslin et al., 2004) e no mesencéfalo (teto óptico e tegmentum) (Clemente et al., 2004; Kaslin et al., 2004; Muller et al., 2004), além do diencéfalo, retina, bulbo olfatório, epitálamo, região ístmica e cerebelo (Clemente et al., 2004; Rico et al., 2011). Em contrapartida, foi relatada a ausência de células colinérgicas no tálamo dorsal e núcleo reticular romboencéfalico, indicando uma possível divergência evolutiva no sistema colinérgico entre espécies da família Cyprinidae (Clemente et al., 2005).

A acetilcolina (ACh) é uma molécula sinalizadora que induz diversas ações na junção neuromuscular e no SNC (Panula et al., 2010). Foi descoberta por Henry Dale em 1914 e posteriormente classificada como neurotransmissor por Otto Loewi em 1930. A partir dessa época, a ACh têm sido associada a funções cognitivas, processamento de funções sensoriais, organização cortical de movimento e controle do fluxo sanguíneo cerebral (Scremim et al., 1997). Possui também função neuromoduladora, pois os níveis desta podem regular a concentração de outros neurotransmissores no cérebro (Cooper, 2005). A ACh, seus

receptores e o aparato enzimático responsável pela sua síntese e degradação compõe o sistema de sinalização colinérgica (Ventura et al., 2010).

1.2.1 Síntese, armazenamento e liberação de ACh

A biossíntese e armazenamento de ACh pode ser dividida em três processos que permitem a recuperação do neurotransmissor hidrolisado de volta ao terminal nervoso: conversão por acetilação, neurotransmissor ativo e, finalmente, armazenamento em vesículas para subsequente liberação na sinapse nervosa (Figura 2) (Siegel et al., 2006).

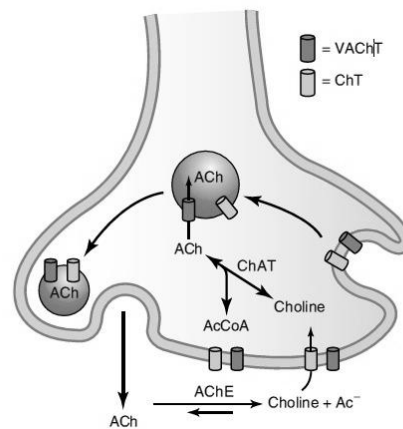


Figura 2 Processo de síntese, degradação e transporte em um terminal pré-sináptico colinérgico. Retirado de Siegel et al., 2006.

A síntese de ACh ocorre a partir da Acetil coenzima A (Acetil CoA), um produto da respiração celular mitocondrial, e colina em uma reação catalisada pela enzima ChAT (Kapczinski et al., 2000). A glicerofosforilcolina, fosforilcolina e fosfatidilcolina geram a colina que será utilizada como substrato na síntese de ACh. A colina também pode ser obtida a partir da reciclagem da ACh que é hidrolisada pela acetilcolinesterase (AChE) na fenda sináptica. A etapa final da síntese ocorre no citoplasma e depois a ACh formada será armazenada em vesículas. Este processo é realizado pelo transportador vesicular de ACh (VAcHT), capaz de elevar em até 100 vezes sua concentração no interior da vesícula (Ventura et al., 2010).

Através de estimulação nervosa, despolarização e conseqüente entrada de cálcio (Ca^{+2}) na célula, as vesículas contendo ACh fusionam com a membrana e liberam seus conteúdos. Após sua liberação, a ACh interage com receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos presentes nas membranas pré- e pós-sinápticas, causando despolarização e propagando o potencial de ação (Ventura et al., 2010, Burgen, 1995; Oda, 1999). A ação excitatória ou inibitória da ACh, nesse momento, dependerá de qual via nervosa será estimulada (Bradford, 1986).

A atividade do neurotransmissor cessa quando a ACh é enzimaticamente hidrolisada pela AChE em acetato e colina. Ao ser liberada a colina é transportada para dentro da terminação nervosa por um transportador de colina (ChT) onde reagirá com acetil CoA para a síntese de mais acetilcolina, completando o ciclo (Siegel et al., 2006).

1.2.2 Receptores

Antes da descoberta das estruturas moleculares, os receptores do sistema nervoso colinérgico foram classificados de acordo com sua afinidade à nicotina ou muscarina (Siegel et al., 2006) sendo divididos, respectivamente, em receptores nicotínicos e receptores muscarínicos. Receptores nicotínicos (nAChR) são ionotrópicos e reconhecem a acetilcolina e a nicotina, substância causadora de dependência. Estão ligados a canais iônicos e sua ativação causa uma rápida resposta celular através do aumento das concentrações de sódio (Na^{+2}) e de cálcio (Ca^{+2}). Foram os primeiros receptores para neurotransmissores caracterizados, quando no início dos anos 1960 ficou estabelecido que α -toxinas de cobras (como a α -bungarotoxina) tinham a capacidade de inativar receptores no músculo esquelético. Esta descoberta levou diretamente à identificação e ao subsequente isolamento dos receptores nicotínicos de ACh (Karlin, 2002; Siegel et al., 2006).

Os nAChR são pentâmeros de massa molecular de ~280kDa. Estudos estruturais mostraram que estes receptores, no cérebro, possuem várias subunidades α 2-10 e β 2-4

arranjadas estruturalmente ao redor de uma cavidade central, com a porção maior da proteína exposta para o meio extracelular (Figura 3). Essa conformação permite a passagem de cátions quando há a ligação da ACh ou nicotina à subunidade α (Jones et al., 1999; Paterson & Nordberg, 2000; Millar & Gotti, 2009).

Os receptores nicotínicos estão localizados no SNC, na medula adrenal, nos gânglios autonômicos e na junção neuromuscular (Sarter and Parikh, 2005) e estão relacionados a diversos processos, como aprendizado e memória, desenvolvimento neuronal e sistema de recompensa (Jones et al., 1999; Siegel et al., 2006; Ventura et al., 2010).

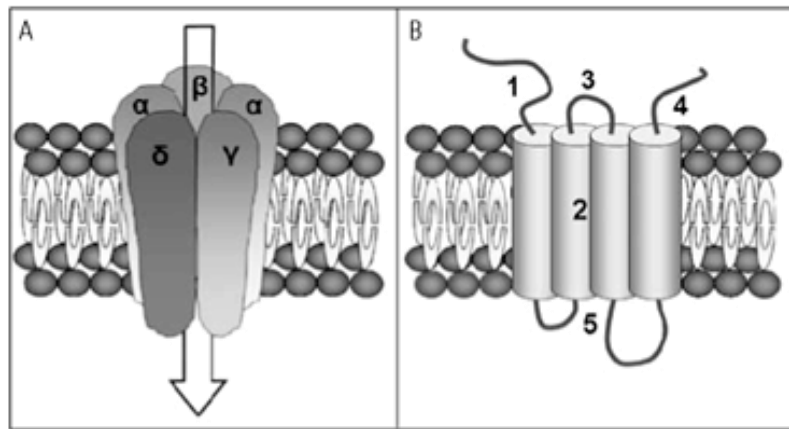


Figura 3 Estrutura do receptor nicotínico. Pode-se perceber as cinco subunidades arranjadas ao redor de uma cavidade central permitindo a passagem de cátions. Retirado de Ventura et al., 2010.

Os receptores muscarínicos são metabotrópicos e produzem uma resposta mais lenta, graças a sua interação com proteínas G, podendo se ligar à acetilcolina ou à muscarina, um alcaloide presente em certos cogumelos venenosos. Estes receptores são encontrados em gânglios do SNP e nos órgãos efetadores autonômicos, como o coração, o músculo liso, o cérebro e glândulas exócrinas (Sarter and Parikh, 2005). Sua estimulação conduzirá a uma despolarização ou hiperpolarização da membrana, sendo capaz de inibir a adenilato ciclase, ativar a enzima fosfolipase C e regular canais iônicos (Cooper et al., 2003; Siegel et al., 2006).

Pelo menos cinco receptores muscarínicos distintos foram clonados e sequenciados: M1, M2, M3, M4 e M5 (Figura 4). Os receptores M1, M3 e M5 são ligados a uma proteína Gq/11, ativam a enzima fosfolipase C, aumentando as concentrações intracelulares de inositol trifosfato (IP3), induzindo a liberação de cálcio intracelular e diacilglicerol (DAG). Os receptores M2 e M4 ativam proteínas Gi e G0, levando a inibição da adenilato ciclase e à ativação de canais de potássio (K⁺) (Caulfield and Birdsall, 1998; Uchiyama and Chess-Williams, 2004; Kapzinski et al., 2000).

No SNC, tais receptores estão envolvidos em funções cognitivas, como memória, aprendizado e atenção, em respostas emocionais, na modulação do estresse, no sono e na vigília (Baghdoyan et al., 1994; Imeri et al., 1994; Caulfield & Birdsall, 1998; Abrams et al., 2006; Ventura et al., 2010). Existem evidências de que esses receptores estejam também relacionados ao controle motor vascular e a regulação da temperatura (Caulfield & Birdsall, 1998).

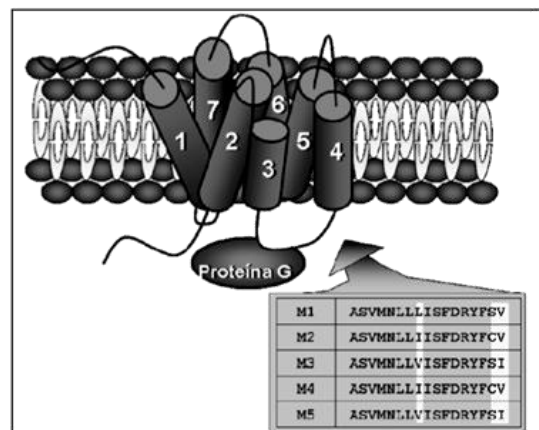


Figura 4 Receptor colinérgico muscarínico detalhando os sete domínios transmembrana e a alça de ligação à proteína G. Em detalhe, parte da sequência de aminoácidos dessa alça revelando a homologia entre as classes de receptores. Retirado de Ventura et al., 2010.

1.2.3 Acetilcolinesterase (AChE)

As colinesterases são enzimas que desempenham papel muito importante na neurotransmissão colinérgica, visto que regulam a quantidade de neurotransmissores na fenda sináptica. Existem dois tipos de colinesterases (Ventura et al., 2010):

- a) enzimas com alta afinidade pela ACh ligadas à membrana neuronal, também chamadas de acetilcolinesterases (AChE), e presentes em todas as sinapses colinérgicas;
- b) enzimas com alta afinidade pela butirilcolina, chamadas de butiril-acetilcolinesterases (BuChE) ou pseudocolinesterases, presentes em todos os tecidos.

Essa especificidade é explicada pela diferença na sequência das enzimas, que resulta em diferentes tamanhos dos seus sítios catalíticos (Delfino et al., 2009). Ambas são encontradas em células gliais e SNC; entretanto, a função fisiológica de BuChE não é totalmente compreendida. Existem relatos da participação de BuChE durante o desenvolvimento sistema nervoso, mas a existência de mutações em humanos impedindo sua expressão demonstra que esta não é essencial para o funcionamento do cérebro (Zinger et al., 2003). Recentemente, tem sido sugerido que esta colinesterase atua como um reservatório enzimático que, em certas condições, serviria para regular os níveis de neurotransmissores na sinapse colinérgica (Delfino et al., 2009). Além de agir, também, como um mecanismo molecular contra anti-AChEs, pois, ao se ligar a estas toxinas, a BuChE impede que a AChE seja destruída (Li et al., 2000; Soreq & Seidman, 2001).

A neurotransmissão mediada pela ACh é um processo vital para a sobrevivência: sua interrupção é letal e sua redução gradual é associada à deterioração das funções cognitivas e neurais, como na doença de Alzheimer, por exemplo (Cummings & Back, 1998). A AChE atua neste sistema, hidrolisando a ACh, terminando sua ligação iônica com o receptor colinérgico e interrompendo a propagação do impulso nervoso (Ventura et al., 2010). No entanto, a AChE não pode ser considerada apenas uma enzima do sistema colinérgico, pois parece estar envolvida em outros processos biológicos, tais como: neuritogênese, adesão celular e

diferenciação e montagem de fibras de amiloide (Soreq & Seidman, 2001; Delfino, et al., 2009).

AChE é uma enzima polimórfica, constituída de subunidades catalíticas globulares. Estas subunidades se agrupam em estruturas oligoméricas que podem ser divididas em duas classes: formas globulares e formas assimétricas. As formas globulares estão presentes, principalmente, no SNC e são formadas por monômeros, dímeros ou tetrâmeros; nos dois últimos casos, as unidades monoméricas são ligadas entre si por pontes dissulfeto e cada uma possui seu sítio ativo. As formas assimétricas, por sua vez, são constituídas de três subdomínios estruturais (a subunidade catalítica, a subunidade colágena e a não colágena) e encontradas no SNP e nas junções neuro-musculares (Rakonczay et al., 2005). Essas formas polimórficas de AChE são encontradas em diversos grupos animais, onde se percebe uma semelhança na atividade das subunidades catalíticas nas formas globular e assimétrica, apesar das suas diferenças estruturais (Quinn, 1987; Delfino et al., 2009).

A AChE é a enzima de maior eficiência catalítica conhecida na atualidade, sendo que seus resíduos de serina, histidina e glutamato possuem papel fundamental para a atividade catalítica (Suusman et al., 1991). Ela controla a transmissão de impulsos nervosos através da sinapse colinérgica pela hidrólise do neurotransmissor ACh em acetato e colina (Quinn, 1987; Milatovic & Dettbarn, 1996). A AChE pode ser utilizada como um marcador da função colinérgica, uma vez que mudanças na atividade desta enzima podem indicar alterações na disponibilidade de ACh e do nível de seus receptores (Fernandes & Hodges-Savola, 1992). Seu gene foi clonado e sequenciado em zebrafish, revelando que apenas um gene é responsável por sua codificação, a qual apresentou aproximadamente 80% de similaridade ao de humanos (Bertrand et al., 2001). Estudos feitos sobre o desenvolvimento do sistema colinérgico em cérebro e retina de zebrafish revelaram a presença de ACh e ChAT desde os primeiros estágios de desenvolvimento (Arenzana et al., 2005), além de apontar a necessidade

deste neurotransmissor para o desenvolvimento neuronal e muscular (Behra et al., 2002). Já foi comprovada, também, a presença das subunidades de receptores muscarínicos e nicotínicos nesta espécie (Zirger et al., 2003).

O zebrafish apresenta uma situação única entre os vertebrados, pois a BuChE, responsável pela hidrólise da butirilcolina, não está presente em seu genoma, tornando a AChE a única colinesterase responsável por regular os níveis de neurotransmissor na sinapse colinérgica e, portanto, um marcador potencial da atividade colinérgica neste animal (Bertrand et al., 2001).

Pesquisas utilizando AChE como marcador de toxicidade em zebrafish já foram conduzidas com sucesso. Foram observadas alterações na enzima quando o animal foi exposto aos agentes tóxicos paration (Roex et al., 2003), metanol (Rico et al., 2006), etanol (Rico et al., 2007), metais pesados (Richetti et al., 2011), ferro (Sant'anna et al., 2011), microcistina (Kirst et al., 2012) e endosulfan (Pereira et al., 2012), indicando sua potencialidade como alvo para análise de toxicidade.

1.3 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO

Partículas em escala nanométrica, mais conhecidas como nanopartículas (NPs), têm despertado grande interesse devido às suas propriedades físico-químicas únicas e seu potencial em aplicações tecnológicas, industriais, ambientais, biológicas e médicas (Leising et al., 1991; Diegues et al., 2006). Essas partículas são definidas como agregados de átomos formadores de partículas de 1 a 100 nm. Atualmente, estão presentes em cosméticos (Perugini et al., 2002), sistemas de entrega de drogas (drug delivery) (Jin et al., 2007), terapia gênica (Czupryna & Tsourkas, 2006) e biosensores (Prow et al., 2006); no entanto, pouco se sabe sobre sua biodistribuição e bioatividade (Asharani et al., 2008). Nanopartículas, de um modo geral, têm sido constantemente estudadas, mas um considerável destaque é dado às nanopartículas magnéticas (MNPs), pois podem ser manipuladas utilizando um campo

magnético e podem apresentar superparamagnetismo, além de possuírem biocompatibilidade, injetabilidade e alta taxa de acumulação no tecido alvo (Ito et al., 2005). Freeman e colaboradores foram os primeiros a introduzirem o conceito de magnetismo no campo médico, em 1960 (Freeman *et al.*, 1960) e, a partir desse momento, estudos têm sido realizados procurando novos vetores que utilizem a magnetização a favor da medicina. As nanopartículas magnéticas (MNPs) consistem, normalmente, de componentes magnéticos, tais como ferro, cobalto ou níquel, que quando sintetizadas em tamanho inferior a 30 nm apresentam magnetização apenas na presença de um campo magnético externo (propriedade de superparamagnetização). A propriedade de superparamagnetismo está diretamente ligada ao tamanho das partículas (apenas aquelas menores de 30 nm são superparamagnéticas). Sendo assim, o controle do tamanho das MNPs durante sua síntese é extremamente importante para manter sua potencialidade para aplicações tecnológicas (Safarik et al., 1995). As MNPs podem ser utilizadas em tratamentos anticâncer por hipertermia (Brigger et al., 2002; Gupta & Gupta, 2005; Ito et al., 2006; Li et al., 2010) e radioterapia (Schutt et al., 1999), realce de contraste em imagens por ressonância magnética (Morales et al., 2003; Qiang et al., 2005; Sun et al., 2008; Liu et al., 2010), separação magnética de células e proteínas (Groman et al., 2007; Zhang et al., 2010; Lee et al., 2006) e carregadores de drogas (Drug delivery) (Namdeo et al., 2008; Sun et al., 2008; Barbincova et al., 2009). Para aplicações biomédicas, é preferível que as partículas apresentem comportamento superparamagnético, pois neste estado elas não possuem magnetização remanescente quando o campo magnético externo é retirado (Wang et al., 2001). Além disso, devem ficar estáveis em água a um pH neutro e salinidade fisiológica.

Nanopartículas de metal e óxido de metal são MNPs e compreendem um grande segmento do mercado da nanotecnologia. Nanopartículas de cobre, por exemplo, têm propriedades bactericidas (Cioffi et al., 2005) e preparações contendo essas partículas são

utilizadas em filtros de água e ar. Nanopartículas de prata também são utilizadas como bactericidas, na fabricação de roupas resistentes a odores, tintas, sensores e catalisadores (Baker et al., 2005; Tang et al., 2007). Mas são as nanopartículas de óxido de ferro que têm se destacado, pois, além de serem utilizadas como adjuvante em ressonância magnética, separação e purificação de células e proteínas e auxiliando na terapia anticâncer, há relatos de serem utilizadas na reparação de tecidos e introdução de ácidos nucleicos em células (Häfeli et al., 1999; Pankhurst et al., 2003).

A aplicação de pequenas partículas de óxido de ferro em diagnóstico *in vitro* é praticada desde a década de 50 (Gilchrist et al., 1957), sendo que nos últimos dez anos o número de pesquisas com vários tipos de óxido de ferro, principalmente magemita Fe_2O_3 e magnetita Fe_3O_4 , com cerca de 50 a 20 nm de diâmetro, aumentou consideravelmente. Com o revestimento adequado, essas partículas podem ser dispersas em solventes, formando suspensões homogêneas chamadas de ferrofluidos (Babincova et al., 2001; Wang et al., 2001). Estes são suspensões coloidais que se mantêm líquidas em campos magnéticos de alta intensidade e, como em função da sua composição, possuem uma combinação única de fluidez e capacidade de interagir com campos magnéticos (Bailey R.L., 1983; Charles & Popplewell, 1980). Tal suspensão pode interagir com um campo magnético externo e ser posicionada em uma área específica, facilitando a ressonância magnética para fins de diagnóstico médico e terapia de câncer com campo magnético (Bonnemain, 1998). Nanopartículas de Fe_2O_3 possuem maior tolerância *in vivo* (Kim et al, 2006; Lacava et al., 1999), mas os efeitos de grandes concentrações de nanoestruturas de Fe_2O_3 na função celular ainda devem ser elucidadas (PisanicII et al., 2007).

Uma das principais características apresentadas por NPs é sua superfície hidrofóbica, com uma elevada razão de área de superfície por volume. Devido a interações hidrofóbicas entre as partículas, elas tendem a se agrupar e formar grandes aglomerados, resultando em

maiores partículas. Esses aglomerados, então, exibem fortes atrações magnéticas dipolo-dipolo e mostram comportamento ferromagnético (Hamley, 2003). Esse fenômeno tem influência não apenas no tamanho e forma das partículas, mas também sobre sua estabilidade quando dispersas em um meio aquoso, podendo precipitar.

Uma vez que a perda da estabilidade coloidal traz sérios prejuízos à maioria das aplicações de MNPs, é indispensável desenvolver estratégias de proteção e estabilização química de sua superfície (Junior, 2011). Atualmente, existem estratégias classificadas em duas categorias: (1) estabilização eletrostática e (2) estabilização estérica (Figura 5).

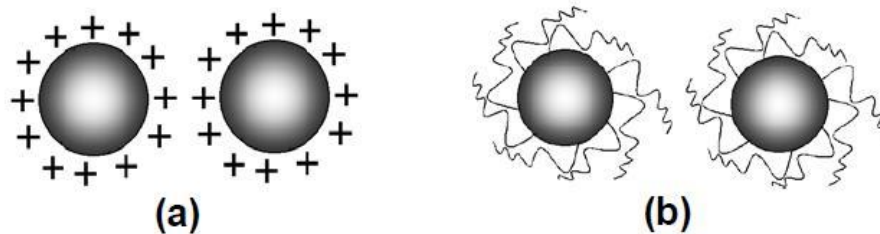


Figura 5 Exemplos dos mecanismos de estabilização da superfície de nanopartículas magnéticas. (a) estabilização eletrostática e (b) estabilização estérica. Retirado de Júnior, 2011.

No primeiro caso, a estabilização é obtida graças à repulsão entre as superfícies eletricamente carregadas das partículas e pode ser controlada através do uso de diferentes solventes de diferentes polaridades (Kuchibhatla et al., 2005). Já na estabilização estérica, o contato entre as partículas é fisicamente evitado, graças ao fato de ambas possuírem um material espaçador (também chamado de agente de revestimento), que pode estar absorvido fisicamente ou ligado covalentemente à superfície (Schmidt, 2007). Além disso, a camada formada pelo grupo espaçador desempenha outros papéis importantes, influenciando tanto nas características individuais (solubilidade, tamanho e estrutura), quanto na distribuição espacial. Diversas substâncias podem ser utilizadas como revestimento, sendo as mais importantes

denominadas surfactantes, que são geralmente constituídos por moléculas orgânicas (Gupta & Gupta, 2005).

Substâncias de revestimentos poliméricos são as mais utilizadas e podem ser classificadas em sintéticas ou naturais. Polímeros baseados em polietileno-co-acetato de vinila, polietilenoglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP) e álcool polivinil (PVA) são exemplos de sistemas poliméricos sintéticos de revestimento. Sistemas naturais de revestimento incluem gelatinas, dextrano, quitosana, entre outros (Schwick & Heide, 1969; Li et al., 1997; Massia et al., 2000; Berry et al., 2003). Vários surfactantes, como oleato de sódio e dodecilamina são geralmente utilizados para aumentar a dispersão em um meio aquoso (Denizot et al., 1999; Dresco et al., 1999; Zaitsev et al., 1999). A Tabela 1 mostra uma lista de materiais que podem ser utilizados na estabilização de nanopartículas metálicas e suas respectivas vantagens.

Tabela 1 Materiais utilizados como revestimento de nanopartículas metálicas para sua estabilização. Retirado de Gupta & Gupta, 2005.

Moléculas/polímeros	Vantagens
Polietileno glicol (PEG)	Imobilização não covalente de PEG melhora a biocompatibilidade, a circulação sanguínea e eficiência na internalização das nanopartículas.
Dextrano	Aumenta o tempo de circulação sanguínea, estabiliza a solução coloidal.
Polivinilpirrolidona (PVP)	Aumenta o tempo de circulação sanguínea, estabiliza a solução coloidal.
Ácidos graxos	Estabilidade coloidal.
Álcool polivinílico (PVA)	Impede coagulação das partículas.
Ácido poliacrílico	Aumenta a estabilidade e biocompatibilidade das partículas e também ajuda na bioadesão.
Polipeptídeos	Ajuda no direcionamento para a célula.
Fosforilcolina	Estabilizar a solução coloidal.
Ácido poliláctico	Biocompatível, baixa citotoxicidade.
Poli (N-isopropilacrilamida) (Poly NIPAAM)	Bom para entrega de drogas (<i>drug delivery</i>) termossensível e separação celular.
Quitosana	Polímero natural biocompatível, hidrófilo, utilizado na agricultura para tratamento de alimentos, medicamentos, biotecnologia, têxteis, polímeros, e água.
Gelatina	Polímero biocompatível natural, utilizado como um agente de gelificação, emulsionante hidrofílico.

A estabilidade coloidal da suspensão dependerá, primeiramente, das dimensões das partículas que devem ser suficientemente pequenas a fim de evitar a precipitação como consequência da força da gravidade e, em segundo, de carga e natureza química da superfície, cuja estabilidade ocorre graças ao seu revestimento. As aplicações biológicas, terapêuticas e de diagnóstico médico requerem, além dessas características, MNPs estáveis em sistemas aquosos com pH neutro. Deve-se ressaltar ainda a importante relação entre o tamanho das partículas e sua circulação em organismos vivos, sendo que estes necessitam ser compatíveis para evitar processos de embolia capilar (Gupta & Gupta, 2005).

Existem hoje diferentes métodos de síntese de MNP, os quais permitem um maior controle sobre as mais variadas características e propriedades do produto final. Métodos físicos como deposição de fase e eletrografia por feixe de elétrons são procedimentos elaborados que se mostraram incapazes de controlar o tamanho das nanopartículas (Rishton et al., 1997; Gupta & Gupta, 2005). As rotas químicas para síntese de NPs são mais simples e mais eficientes no controle do tamanho, composição e, muitas vezes, na forma da partícula (Gupta & Wells, 2004; Gupta & Gupta, 2005). Dentre esses métodos destacam-se: Coprecipitação (Nedcov et al., 2006; Liu et al., 2008), sistemas miscelares ou microemulsão (López-Pérez et al., 1997), pirólise à laser (Veintemillas-Verdaguer et al., 2003) e decomposição/redução térmica (Park et al., 2004). Após a síntese das NP é necessário um processo de caracterização para confirmar o tamanho médio das partículas, tais como técnica de espalhamento e difração de raio X, espectrometria de massa com ionização à laser, microscopia eletrônica de varredura ou de transmissão e UV visível (Gonçalves et al., 2009; Qiu et al., 2009).

1.3.1 Metabolização e excreção de NPs

Uma vez internalizado, o mecanismo intracelular envolvido na degradação de SPIONs é mediado por lisossomas (Arbab et al., 2005; Levy et al., 2010), onde, por meio de mudanças no pH, ocorre a libertação de Fe livre para o meio celular através de um transportador de metais divalentes (DMT-1). O ferro é, então, armazenado no corpo com a ajuda de proteínas de regulação do ferro como a ferritina. O transporte de ferro na circulação sanguínea é realizado pela proteína plasmática transferrina. Esta proteína, sintetizada principalmente no fígado, tem a capacidade de se ligar em até dois átomos de ferro no estado oxidado (Fe^{3+}), carregando o íon para os diversos compartimentos do corpo humano (Hoffbrand et al., 2005). No caso de excesso de ferro a capacidade da transferrina é excedida e o ferro acaba se acumulando no sangue sendo, futuramente, excretado. A excreção dos SPIONs pode depender do seu tamanho e do revestimento. A maioria das NPs são excretadas por via renal, uma vez que esta via reduz a criação de espécies reativas de oxigênio e sua consequente toxicidade (Wahajuddin e Arora, 2012). SPIONs revestidos com dextran são eliminadas através da urina e das fezes durante um período de sete semanas, como foi relatado por Bourrinet e colaboradores (2006).

Atualmente uma das maiores preocupações quanto à utilização de partículas inorgânicas em biomedicina gira em torno de sua toxicidade. Assim, MNP de ferro, em especial magnetita (Fe_3O_4) e maghemita (Fe_2O_3) têm sido extensamente estudadas quanto a suas utilizações biomédicas, uma vez que se tratam de compostos com baixa toxicidade se comparados com metais ou óxidos de outros metais de transição como cobalto, níquel ou manganês (Tartaj et al., 2003).

Vários estudos têm sido realizados para avaliar o efeito bactericida de NPs de óxidos de metal (Wei et al., 1994; Sawai et al., 1996; Fako & Furgeson, 2009), bem como os efeitos

destas em culturas de células *in vitro* (Braydich-Stolle, 2005; Hussain et al., 2005) e em pulmões de ratos (Warheit et al., 2006).

No zebrafish, já foi estudado o efeito de NPs de óxido de ferro em embriões em suspensão aquosa (Zhu et al., 2008). Resultados que equivalem aos obtidos por Bai e colaboradores (2010), onde foi relatado um atraso na eclosão e desenvolvimento do embrião, malformações e diminuição do peso larval. Já foram relatadas altas taxas de toxicidade de nanopartículas de cobre (Griffitt et al., 2009; Karlsson et al., 2009) e prata (Griffitt et al., 2009; Asharani et al., 2008). Powers e colaboradores (2011) observaram além de toxicidade, mudanças comportamentais relacionadas à exposição à nanopartículas de prata. Em contraste, Warheit e co-autores (2006) relataram que NPs de TiO₂ não se mostraram mais tóxicas em comparação com partículas maiores e que a toxicidade das partículas de quartzo não é dependente do tamanho da partícula, mas sim da reatividade da superfície (Warheit et al., 2007). Estudos recentes *in vitro* têm mostrado que não existe diferença entre micro e nanopartículas (Park et al., 2007) e que partículas de óxido de metal de tamanho nano e micro possuem baixa potência para induzir citocinas pró-inflamatórias (Veranth et al., 2007). Raju e colaboradores (2011) observaram uma diferença na precipitação de ferro em tecido ocular de rato, quando comparadas partículas nano e micro, sendo que as partículas em nanoescala mostraram menor taxa de precipitação de ferro e nenhuma toxicidade.

A diferença nos resultados encontrados em estudos envolvendo ratos e zebrafish pode ser explicado pelo fato de haverem poucas pesquisas que utilizem *Danio rerio* na fase adulta. Além disso, pesquisas que utilizam zebrafish e nanopartículas, normalmente utilizam protocolos de dispersão de NPs no ambiente aquático. Esse fato reforça a necessidade de estudos com este animal.

Foi comprovado que NPs têm a capacidade de ultrapassar a barreira hemato-encefálica e se acumularem no cérebro (Kim et al., 2005), indicando a necessidade da realização de

estudos para avaliar os possíveis efeitos tóxicos no cérebro causados pela exposição às as MNPs. Levando em consideração às observações de Sant'Anna e colaboradores (2011) de que a exposição ao ferro em zebrafish modificou a atividade da acetilcolinesterase e que células neurais são especialmente suscetíveis à toxicidade por ferro (Crichton et al., 2002), estudos abordando os aspectos neurotóxicos de nanopartículas de óxido de ferro trarão importantes observações a esse crescente campo de nanobiotecnologia.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste projeto foi avaliar os efeitos causados pela exposição de nanopartículas de óxido de ferro dextran-aminadas (CLIO-NH₂) em cérebro de zebrafish (*Danio rerio*) adulto. Este objetivo foi construído fundamentado nos seguintes predispostos: (1) zebrafish é um modelo experimental consolidado nas áreas de neurobiologia, toxicologia e biologia molecular; (2) o sistema colinérgico é considerado modelo para neurotoxicologia; (3) importantes enzimas e receptores deste sistema de neurotransmissão já foram descritas nesta espécie e apresentam grande similaridade com as presentes em seres humanos e (4) o crescente interesse na utilização de nanopartículas de ferro em diferentes áreas da biomedicina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito *in vivo* da exposição aguda de CLIO-NH₂ (10mg/ml) sobre a atividade da acetilcolinesterase em cérebro de *zebrafish*, nos períodos de 1, 16, 24 e 48 h;
- Avaliar o padrão de expressão do gene que codifica AChE em cérebro de *zebrafish* após tratamento com CLIO-NH₂;
- Avaliar as alterações comportamentais de locomoção em *zebrafish* após tratamento com CLIO-NH₂.
- Avaliar a quantidade de íon ferro (Fe⁺²) em cérebro de *zebrafish*, após tratamento com CLIO-NH₂.

3 LOCAL DE EXECUÇÃO

Os experimentos de ensaios Bioquímicos e Moleculares do estudo foram realizados na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Biociências, Departamento de Biologia Celular e Molecular, no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, e no Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia. A análise dos níveis de Fe^{++} foi realizada no Instituto de Toxicologia e Farmacologia.

O vivário dos animais está localizado na mesma universidade, no Museu de Ciências e Tecnologia, Prédio 40, na Sala de Animais Aquáticos.

A síntese e caracterização das nanopartículas de óxido de ferro dextran-aminadas foram realizadas no Laboratório de Síntese de Materiais Nanoestruturados, Faculdade de Biociências, também na PUCRS.

CAPÍTULO II

“Transient modulation of brain AChE activity as a response to the effects caused by exposure to dextran-coated iron oxide nanoparticles in adult zebrafish.”*

***Manuscrito submetido na revista Neurotoxicology.**

Transient modulation of brain AChE activity as a response to the effects caused by exposure to dextran-coated iron oxide nanoparticles in adult zebrafish.

Giovanna Medeiros Tavares de Oliveira¹, Luiza Wilges Kist^{1,2}, Talita Carneiro Brandão Pereira¹, Josiane Woutheres Bortolotto³, Francisco Lima Paquete⁴, Elisa Magno Nunes de Oliveira⁴, Carlos Eduardo Leite⁵, Carla Denise Bonan^{2,3}, Nara Regina de Souza Basso⁴, Ricardo Meurer Papaleo⁴, Maurício Reis Bogo^{1,2,5*}.

¹Laboratório 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.

²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), Porto Alegre, RS, Brazil;

³Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴Laboratório de Síntese de Materiais Nanoestruturados, Faculdade de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

⁵Instituto de Toxicologia e Farmacologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author:

Maurício Reis Bogo, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681 - 12C - sala 172, Zip Code: 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3353 4726; fax: +55 51 3320 3568. E-mail address:

mbogo@pucrs.br.

Abstract

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) are of great interest in nanomedicine due to their capability to act simultaneously as a contrast agent in magnetic resonance imaging and as a targeted drug delivery system with good biocompatibility. At present, one of the biggest concerns about the use of SPIONs remains around its toxicity and for this reason, it is important to establish the safe upper limit for each use. In the present study, SPION coated with cross linked and aminated dextran (CLIO-NH₂) were synthesized by the co-precipitation method. The magnetite core size was 5.5 ± 1.4 nm, on a concentration of 10 mg Fe-NPs/ml. The number-averaged diameter measured with Nano-Zs Zetasizer was 23 ± 8 nm and the transversal to longitudinal relaxivity ratio R₂/R₁ was between 13 and 24 in the various batches produced. We have evaluated the effect of different CLIO-NH₂ doses (20, 50, 100, 140 and 200 mg/kg) as a function of time after exposure (one, 16, 24 and 48 hours) on AChE activity and *ache* expression in zebrafish brain. In the concentrations tested, only the animals exposed to 200 mg/kg and tested 24 h after administration of the nanoparticles have shown decreased AChE activity. The RT-qPCR results suggested that the inhibition of brain AChE is not directly related with the transcriptional control and it was probably due to a post-transcriptional event. Once ACh is recognized to play an important role in the regulation of locomotor control, we further evaluated parameters of zebrafish swimming activity. CLIO-NH₂ at 200mg/Kg evaluated after 24 h also impaired all the tested parameters of zebrafish swimming activity, i.e. decreased traveled distance, mean speed, number of line crossings, and turn angle. We further investigate the iron accumulation in zebrafish brain by ICP-MS and a significant higher level of ferric iron was found in zebrafish brains exposed to CLIO-NH₂. In summary, the results presented herein provide further experimental evidence that high doses of exposure to dextran-coated iron oxide nanoparticles can be transiently neurotoxic.

Keywords

Nanoparticles, SPIONs; CLIO-NH₂; AChE; Neurotoxicity; Zebrafish

Introduction

Magnetic nanoscale particles or nanoparticles (MNPs) have attracted great interest in recent years due to their unique physical and chemical properties and their potential applications in various biomedical fields (Leising *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2001). They consist of small domains (usually smaller than 100 nm), containing magnetic atoms such as iron, cobalt or nickel that can be easily manipulated or enhance visualization of the bodies they reside, using an external magnetic field (Wang *et al.*, 2001). Among the various magnetic particles, superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) are of particular interest. SPIONs have a core of up to 30nm in diameter, usually wrapped in organic coatings. Superparamagnetism provides a strong magnetic response when the particles are exposed to an external magnetic field, but no residual magnetization when the field is removed, and consequently, agglomeration of the particles is less likely to occur. In addition, these particles present biocompatibility, injectability, and may have a high rate of accumulation in the target tissue if adequate ligands are attached to their surfaces (Ito *et al.*, 2005). Iron oxide nanoparticles have found a great number of biomedical applications, especially as contrast agents in magnetic resonance imaging (Pouliquen *et al.*, 1991; Morales *et al.* 2003; Qiang *et al.* 2005; Peng *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2009), but also in magnetic separation of cells and proteins (Groman *et al.* 2007), in drug (Lubbe *et al.*, 1996; Babes *et al.*, 1999; Rudge *et al.*, 2001; Namdeo *et al.*, 2008, Sun *et al.*, 2008; Babincova *et al.*, 2009) and gene delivery (Hood *et al.*, 2002); in anticancer treatments by hyperthermia (Brigger *et al.* 2002; Gupta & Gupta, 2005; Ito *et al.* 2006; Li *et al.* 2010) and purification procedures (Shen *et al.*, 2009).

Although excess iron content can be eventually incorporated into the blood pool of the body, and some formulations of iron oxide nanoparticles (e.g. Ferridex and Resovist) have already been approved for human use, there are several forms of the particles functionalized with different chemical groups, fluorophores, drugs or targeting species that may alter

substantially the toxicological profile of the particles and their overall *in vivo* behavior. Thus, it is important to establish the safe upper limit for each use and nanoparticle formulation.

Diverse aspects of the *in vitro* toxicity of SPIONs including cytotoxicity, oxidative stress generation, inflammatory reactions and genotoxicity were investigated and are well documented in the literature (for review, see Mahmoudi et al., 2012). Even though the *in vivo* toxic effects of SPIONs are still mostly unknown, some general aspects of the SPIONs' toxicity have already been addressed. For instance, ionic and citrate-based magnetic fluids administered intraperitoneally to mice caused severe inflammatory reactions, being very toxic and not biocompatible (Lacava et al., 1999). Rats that had been intravenously injected with γ -Fe₂O₃ NPs (0.8 mg/kg) presented toxicity in liver, kidneys and lungs (Hanini et al., 2011). Rats treated with 8.5 mg/kg of Fe₂O₃ NPs have shown acute inhalation toxicity (Wang et al., 2010). Acute oral exposure to Fe₂O₃-30 NPs caused more than 50% inhibition of total Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾, Mg⁽²⁺⁾, and Ca⁽²⁺⁾-ATPases activities in brains of female rats and activation of the hepatotoxicity marker enzymes, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in serum and liver (Kumari et al., 2013). In accordance, due to Fe₂O₃-30 NPs 28 days repeated oral dose, significant inhibition was observed in total Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾, Mg⁽²⁺⁾, and Ca⁽²⁺⁾-ATPases activities in brain of exposed rats (Kumari et al., 2012).

The zebrafish (*Danio rerio*) is a small freshwater teleost recognized as a consolidated experimental model for studying several biological events. More recently, zebrafish has also become a promising model organism for developmental neurobiology (Grunwald and Eisen, 2002), pharmacological (Goldsmith, 2004) and toxicological studies (Linney et al., 2004; Hill et al., 2005). Among their greatest assets are its small body size, sensitivity to drugs, and the ability to rapidly absorb chemicals from the water and then to accumulate them in several tissues (Goldsmith, 2004; Hill et al., 2005). In addition, different neurotransmitter systems have been identified in this species such as glutamatergic (Edwards and Michel, 2002; Tabor

and Friedrich, 2008), cholinergic (Behra et al. 2002; Clement et al. 2004; Arenzana et al. 2005; Senger et al., 2006b; Edwards et al., 2007), dopaminergic (Boehmler et al., 2004; Ryu et al., 2006; Russek-Blum et al., 2008), serotonergic (Rink and Guo, 2004; Lillesaar et al. 2007; Norton et al. 2008), histaminergic (Kaslin and Panula, 2001), GABAergic (Kim et al. 2004; Delgado and Schmachtenberg, 2008) and purinergic (Rico et al. 2003; Senger et al. 2004; Low et al. 2008).

In cholinergic neurotransmission, acetylcholine (ACh) promotes the activation of muscarinic and nicotinic cholinergic receptors. The maintenance of levels of ACh in the extracellular space is catalyzed by acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE), by the hydrolysis of ACh into its component parts choline and acetate (Soreq and Seidman, 2001). 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).

The inhibition of AChE activity for assessment of the exposure of organisms to organophosphate and carbamate pesticides is well-known (for review see Van Dyk and Pletschke, 2011). However, other toxic compounds than organophosphate and carbamate pesticides both promoted AChE inhibition and AChE activation in fish. For instance, the inhibition of zebrafish brain AChE activity by neurotoxic compounds such as methanol (Rico et al., 2006), lithium (Oliveira et al., 2011), the heavy metals mercury and lead (Richetti et al., 2011), and the organochlorine pesticide Endosulfan (Pereira et al., 2012) has been demonstrated. Notwithstanding, AChE activation has also been demonstrated as a consequence of exposure to toxic substances such as ethanol (Rico et al., 2007), aluminum (Senger et al., 2011) and Microcystin-LR (Kist et al., 2012).

Thus, considering that (1) SPIONs have already found innumerable biomedical and technical applications; (2) it is crucial to establish the safe upper limit for each SPION's use;

(3) the *in vivo* neurotoxic effects of SPIONs are still mostly unknown; (4) AChE activity is successfully used as a biomarker of brain toxicity, the aim of the present study was to evaluate the effects caused by exposure to dextran-coated SPIONs in the brain using adult zebrafish as the organism model.

Materials and methods

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) 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®. 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 12/00288.

Chemicals

Trizma Base, ethyle-nedioxy-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 Aldrich Chemical Co

(St.Louis,MO,USA). TRIzol® reagent, ImPROm-II Reverse Transcriptase® (Promega, Madison, Wisconsin, USA), Platinum® Taq DNA Polymerase and GelRed® were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Dextran coated SPIONs synthesis and characterization

Iron oxide (Fe_3O_4) nanoparticles coated with cross linked and aminated dextran (CLIO- NH_2) were synthesized by the co-precipitation method in alkaline environment, based on the procedure described previously (Wunderbaldinger et al., 2002). The synthesis was made by dissolution of dextran (T10, pharmacosmos) in an aqueous medium and mixed with salts of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Merck) with a molar ratio of 2:1, in cold environment and N_2 flux. NH_4OH (25%, Merck) was added slowly in the solution and stirred at 75-85°C for 1 h 30 min. To eliminate the dextran excess, the mixture was centrifuged in Amicon® filters with a molecular weight cutoff of 50 kDa. Cold 5M NaOH (Merck) was added slowly and stirred for 15 minutes and then epichlorohydrin (Fluka) was added for the crosslinking of the dextran chains. For amination of the dextran coating, NH_4OH (25%, Merck) was added in the NP solution and stirred for additional 24 h. After that, the remaining NH_4OH was eliminated by dialysis, using cellulose membranes (Spectra/Por®) submerged in distilled water under continuous magnetic stirring. Water was exchanged several times in this process. The resulting CLIO- NH_2 nanoparticles were dispersed in sodium citrate buffer at pH 8 and stored at 4°C.

For characterization, all samples were initially sonicated (40 kHz) and stirred in a vortex and then the desired aliquots collected. Iron concentration was determined by UV-Vis spectroscopy (Lambda 35, Perkin Elmer), using the absorbance at 410 nm. The concentration was obtained interpolating the absorbance value of the NP solution in a calibration curve made from Fe atomic spectroscopy standards. The [Fe] of the stock solution was

approximately 10mg/mL. The hydrodynamic diameter of the NPs in aqueous solution was measured with a Nano-ZS Zetasizer (Malvern). Elemental composition of the dried NPs on Si substrates was measured by Rutherford backscattering spectroscopy (RBS), using a 2 MeV He beam and a detection angle of 165° and by RX energy dispersion spectroscopy.

The nuclear magnetic relaxation properties of the particles on water protons were obtained in a 3T clinical magnetic resonance scanner (SIGNA XDXT, G&E), imaging a phantom containing NP solutions with eight different concentrations, using spin echo or inversion recovery sequences.

Animal procedures

Intraperitoneal (i. p.) injection was adopted as the administration route for the *in vivo* protocols to ensure that exposure concentrations are in line with target values. Intraperitoneal injections were conducted using a 3/10-mL U-100 BD Ultra-Fine™ Short Insulin Syringe 8 mm (5/16") × 31G Short Needle (Becton Dickinson and Company, New Jersey, USA) according to the protocol established by Phelps and colleagues (2009). Briefly, the volume injected into the animal (mean injection volume of 10 µL) was adjusted to the fish bodyweight (mean mass of the animals was 0.5 ± 0.06 g / Mean \pm S.E.M.) to achieve 200 mg/kg. The animals of the control group received the same volume of saline solution and the animals of the vehicle control received the same volume of sodium citrate buffer. Anesthesia of the animals prior to the injection was obtained by immersion in a solution of tricaine (0.01%) 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 the animals that did not recover during this period were discarded. One, 12, 24 and 48 h after the injection, the animals were euthanized by decapitation and the brains dissected for subsequent determination of AChE activity and molecular analysis. The concentrations of CLIO-NH₂ were chosen based on previous studies (Kim et al., 2005; Chertok et al., 2008 and Kumari et al., 2012).

Protein determination

The protein was determined by the Coomassie blue method according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

Determination of AChE activity

Whole brains were removed by dissection (three whole brains for each sample) and homogenized on ice in 60 volumes (v/w) of Tris–citrate buffer (50 mM Tris, 2 mM EDTA, and 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). The samples containing protein (5 μ g) and the reaction medium were pre-incubated for 10 min at 25 °C before the addition of substrate. 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. The AChE activity was expressed as micromoles of thiocholine (SCh) released per h per mg of protein. All enzyme assays were evaluated in triplicate and at least three independent experiments were performed.

Molecular analysis by RT-qPCR (quantitative PCR)

Gene expression analysis was carried out only when kinetic alteration occurred. For this reason, immediately after 24 h of intraperitoneal injection of the SPIONs, the animals were euthanized by decapitation. For each sample, a pool of three zebrafish whole brains was used. Total RNA was isolated using the TRIzol® reagent (Invitrogen) in accordance with the manufacturer's instructions. By calculating the ratio between absorbance values at 260 and 280 nm the purity of the RNA is asserted. The cDNA species were synthesized using ImPROm-II Reverse Transcriptase® (Promega, Madison, Wisconsin, USA), following supplier's instructions. Quantitative PCR was performed using SYBR® Green I (Invitrogen) to detect the synthesis of the double strand. The reactions had a total volume of 25 µL, using 12.5 µL of diluted cDNA (1:100 for EF1α and Rlp13α, and 1:20 for ache) containing a final concentration of 0.2 x SYBR® Green I (Invitrogen), 100 mM dNTP, 1 x PCR buffer, 3 mM MgCl₂, 0.025 U Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) and 200 nM of each primers (Table1). PCR reactions had the following conditions: 95 °C during five minutes for initial denaturation and polymerase activation, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15s, 60 °C to annealing for 35s and extension for 15s at 72 °C. At the end of cycles a melting curve analysis is added and the fluorescence determined between 60-99 °C. The relative expression levels were determined with 7500 Fast Real-Time Software v.2.0.5 Sequence Detection System (Applied Biosystems). The efficiency for each sample was calculated using the software LinRegPCR 11.0 (Applied Biosystems) and the stability of EF1α and Rlp13α

genes (M value) and the optimal number of reference genes according to the pairwise variation (V) were analyzed by geNorm (<http://medgen.ugent.be/genorm/>). The relative expression levels were determined using the method $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Behavior analysis

The animals were intraperitoneally injected with CLIO-NH₂ or saline solution (control group) and after 24 h the behavior tests were performed as previously described (Gerlai et al., 2000; Egan et al., 2009). Zebrafish were placed individually in the experimental tanks (30 cm L x 15 cm H x 10 cm W) filled with treated water. Once the animals were transferred to the experimental tank, they habituated for 30 s and the locomotor activity was recorded on video for 5 min. The tank was divided into equal sections (four vertical lines and one horizontal line) and during this time the following parameters were recorded: number of line crossings (vertical and horizontal lines), distance traveled (m), mean speed (m/s), absolute turn angle, time in upper zone, number of freezing (lack of movement for the period of 1s or longer) and freezing duration. The videos were analyzed using ANYMaze software (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA).

Analysis of temporal absorption of iron by ICP-MS

The levels of iron in zebrafish brain were assessed by inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), according to the method described by Ashoka et al. (2009), with minor modifications. Briefly, pools of 3 brains were washed with saline solution (0.9%), and digested with 0.5 mL of 65% HNO₃ (Suprapur / Merck) and 0.1 mL of 37% HCl (ACS / Merck) in a glass tube. After, samples were placed for 2 h in a water bath at 85 °C and diluted to 5 mL with a 1 % solution of HNO₃. Subsequently, the samples were placed in the

automatic sampler to analyze. The iron calibration curve was linear in the range of 10-1000 ppb ($\mu\text{g/L}$), and the results were expressed in μg per sample (pool of 3 brains).

Statistical analysis

AChE activity were expressed as means \pm S.E.M. and analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). Post-hoc comparisons were made using Tukey's test, considering $p \leq 0.05$ as statistical significance. Molecular data were expressed as means \pm S.E.M. and analyzed by Student's t-test considering $p \leq 0.05$ as statistical significance.

Results

Typical size distribution of the synthesized CLIO-NH₂ nanoparticles is shown in Figure 1. The magnetite core size, estimated from transmission electron microscopy images was 5.5 ± 1.4 nm (Figure 1a). The number-averaged hydrodynamic diameter measured in an aqueous solution was 23 ± 8 nm (Figure 1b). Elementary composition analysis of the particles indicated only the presence of Fe, O and trace elements from the citrate buffer, (Na and Cl). The transversal to longitudinal relaxivity ratio R₂/R₁ was between 13 and 24 in the various batches produced.

Initially a dose-response curve was performed using CLIO-NH₂ concentrations from 20 to 200 mg/Kg. Zebrafish brain AChE activity was evaluated 24 h after i.p. injections (Figure 2). CLIO-NH₂ concentrations from 20 to 140 mg/Kg did not alter AChE activity in zebrafish brains. However, the enzyme activity was significantly decreased at the highest tested concentration (200 mg/Kg) when compared to the control (20.4%) and buffer control (18.2%) groups. Sequentially, a time-related curve was obtained using CLIO-NH₂ at 200 mg/Kg. Zebrafish brain AChE activity was evaluated after one, 16, 24 and 48 h of exposure (Figure 3). One, 16 and 48 h of exposition did not alter AChE activity in zebrafish brain. Of

note, the AChE activity after 24 h presented a significant decrease (27.47 ± 0.628 $\mu\text{mol SCh.h}^{-1}\text{.mg protein}^{-1}$; $p=0.0032$) when compared to the control (34.52 ± 0.952 $\mu\text{mol SCh.h}^{-1}\text{.mg protein}^{-1}$) and buffer control (31.38 ± 1.39 $\mu\text{mol SCh.h}^{-1}\text{.mg protein}^{-1}$) groups.

The decrease in brain AChE activity after 24 h exposure to 200 mg/Kg of CLIO-NH₂ could be a consequence of transcriptional control and/or post-transcriptional modifications. In order to determine if *ache* transcriptional regulation had occurred, RT-qPCR analysis was performed. The results demonstrated that AChE transcript levels were not altered when compared to the control group (Figure 4). This result indicates that the down-regulation of the AChE activity was not directly related to the inhibition of the gene *ache* expression.

Once ACh is known to play an important role in the regulation of locomotor control, we further evaluated parameters of zebrafish swimming activity in the 5-min tank diving behavioral test. Exposure to 200mg/Kg of CLIO-NH₂ during 24h decreased traveled distance (17.9 ± 2.36 meters, $p=0.0018$ compared to the control group 35.2 ± 3.96 meters and to the buffer control group 22.4 ± 3.37 meters), number of line crossings (240 ± 25.4 , $p=0.0141$ compared to the control group 418 ± 58.3 and to the buffer control group 242 ± 40.9) and mean speed (0.028 ± 0.00403 meters/second, $p=0.0041$ compared to the control group 0.0554 ± 0.00697 and to the buffer control group 0.0356 ± 0.00560). Exposure to 200 mg/Kg of CLIO-NH₂ during 24 h also decreased absolute turn angle ($47,500 \pm 7,240$, $p=0.0092$) when compared to the control group ($78,200\pm 7,110$), whereas it did not differ statistically from the buffer control group ($50,500\pm 7,840$) (Figure 5). The time spent in the upper zone (54.87 ± 26.19 sec) was not altered when compared to control (47.35 ± 10.87 sec, $p=0.7739$) and buffer control (69.05 ± 23.63 seconds) groups (data not shown). In addition, we did not find differences either in number of freezing or freezing duration between the groups analyzed.

Finally, the down-regulation in brain AChE activity and the impaired swimming performance parameters evaluated after 24h exposure to 200 mg/Kg of CLIO-NH₂ could be

explained by iron accumulation in the brains. Inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was employed to quantify iron levels in the brain tissue. The results indicated a significant higher level of ferric iron in zebrafish brains treated with CLIO-NH₂ (1.351±0.1322 µg, p=0.0123) when compared to the control (0.904±0.0683 µg) and buffer control (0.761±0.1067 µg) groups (Figure 6).

Discussion

At present, one of the biggest concerns about the use of SPIONs remains around its toxicity. SPIONs synthesized of magnetite (Fe₃O₄) or maghemite (Fe₂O₃) have been extensively studied once these compounds have lower toxicity when compared to other transition metals such as cobalt, nickel or manganese (Tartaj et al. 2003). In addition, the surface coating can have important effects on SPIONs stability, aggregate size and cellular interaction which affects the SPIONs uptake in the intracellular medium (Raynal et al., 2004) resulting in toxic effects. The dextran-coated SPIONs were used in this study once they are recognized to improve biocompatibility, to enhance blood circulation and to reduce aggregation (Mahmoudi et al., 2011).

There are different methods of synthesis of NPs that allow greater control over the most varied characteristics and properties of the final product. Between them, the chemical routes such as co-precipitation, are simpler and more efficient to control the size, composition, and often the shape of the particle, being one of the most secure methods (Gupta & Wells, 2004; Gupta & Gupta, 2005). In this study, the transversal to longitudinal relaxivity ratio R₂/R₁ was between 13-24, in the various batches of the dextran-coated SPIONs produced, which is close, but higher than those found for typical iron oxide contrast imaging formulations (Laurent et al., 2008; Geraldès et al., 2009).

Some issues concerning the toxic effects caused by SPIONs exposure were already addressed using zebrafish as an organism model. For example, Zhu and colleagues (2012)

showed that ≥ 10 mg/L of SPIONs exposure instigated developmental toxicity in zebrafish embryos, causing mortality, hatching delay, and malformation. In the present study, we have evaluated the effect of different CLIO-NH₂ doses (20, 50, 100, 140 and 200 mg/kg) and different times of exposure (one, 16, 24 and 48 h) on AChE activity and *ache* expression in zebrafish brain. In the concentrations tested, only the animals exposed to 200 mg/kg for 24 h have shown decreased AChE activity. The RT-qPCR results suggested that inhibition of brain AChE is not directly related with the transcriptional control and it was probably due to a post-transcriptional or even a post-translational event.

To the best of our knowledge, only two other studies have evaluated the toxic effects of SPIONs exposure over brain AChE activity. Repeated oral dose of Fe₂O₃-30 nanoparticles during 28 days caused a significant inhibition of brain AChE activity in a female Wistar rat model (Kumari et al., 2012). Acute oral exposure to Fe₂O₃-30 nanoparticles also resulted in a significant inhibition of brain AChE activity, as well as in red blood cells in a female Wistar rat model (Kumari et al., 2013). The results reported herein are in accordance with these two studies and suggest that synaptic transmission can be affected by exposure to SPIONs.

It is well-documented that inhibition of AChE leads to an increase in the ACh accumulation in the brain leading to an over-stimulation of cholinergic receptors. As a result, a decline in neural and muscular control occurs. There are some reports in the literature linking inhibition of the zebrafish AChE activity and behavioral changes with the exposure to pollutants and/or toxic agents. For instance, exposure to 2.4 μ g endosulfan/L (organochlorine pesticide) for 96 h, a condition that resulted in brain AChE inhibition, also impaired exploratory parameters of adult zebrafish (Pereira et al., 2012). The organophosphorus pesticide chlorpyrifos (300 nM dissolved in water) over the first five days of embryonic and larval development of zebrafish reduced both AChE (81%) and locomotor activities (35%) (Yen et al., 2011). In the present study, exposure to 200 mg/Kg of CLIO-NH₂ during 24h, a

condition that inhibited the brain AChE activity, also impaired all the evaluated parameters of zebrafish swimming activity, i.e. decreased traveled distance, mean speed, number of line crossings, and turn angle. It is important to highlighted that the exposure to the buffer control group was also harmful to the fishes suggesting that part of the toxic effects found in the behavior tests are due to the buffer used to store the CLIO-NH₂ nanoparticles. Nevertheless, the nanoparticles exposure decreased traveled distance, mean speed, number of line crossings in a way that was statistically different from the buffer control group. These findings showed that CLIO-NH₂ exposure impaired zebrafish's exploratory performance and possibly weakened their ecological and interspecific interaction.

The metabolization and excretion of the NPs is of major importance for understanding SPIONs mechanism of toxicity. Once internalized, the intracellular mechanisms involved in the degradation of SPIONs are lysosome-mediated (Arbab et al., 2005; Levy et al., 2010), releasing free Fe (III) into the cellular medium via divalent cationic transport. The iron is then stored in the body with the help of the iron-regulating proteins. The transport of iron in the blood is performed by plasma protein transferrin and can accumulate in the case of iron overload. In this scenario, iron is excreted via the kidney since this route reduces the creation of reactive oxygen species and their consequent toxicity (Wahajuddin and Arora, 2012).

One plausible explanation to the down-regulation in brain AChE activity and the impaired swimming performance parameters evaluated after 24-h exposure to 200 mg/Kg of CLIO-NH₂ could be the iron accumulation in zebrafish brain. In order to investigate the hypothesis raised, ICP-MS analysis was carried out. The results showed a significant higher level of ferric iron in zebrafish brains treated with CLIO-NH₂. This scenario was reversed in the next 24 h (AChE activity was not down-regulated after 48 hs exposure to 200 mg/Kg of CLIO-NH₂) where iron accumulated in brain might be metabolized or excreted by the body allowing cells to return to homeostasis. Dextran-coated SPIONs have been reported to be

eliminated via the urine and feces over a 7 weeks period (Bourrinet et al., 2006). For this reason, the determination of the iron content in zebrafish brains after 48 h exposure to 200 mg/Kg of CLIO-NH₂ could help to answer this question.

In vivo studies often classified SPIONs as biocompatible without severe neurotoxic effects (Jain et al., 2008; Chertok et al. (2008); Yu et al. (2008) and Schlachter et al. (2011). In addition, it has been mostly shown that toxic effects were associated with acute iron overload (Patruta and Horl, 1999) caused by high doses SPIONs exposure (Kumari et al., 2012; Kumari et al., 2013). The same results were reported by Lubbe et al. (1996), where toxicity appeared only in patients treated with high doses of magnetic drug targeting.

In summary, the results presented in this article provide further experimental evidence that SPIONs exposure can be transiently neurotoxic. Adult zebrafish exposed 24h to 200 mg/Kg showed a significant higher level of ferric iron in the brains, down-regulation in brain AChE activity and the impaired swimming performance parameters. These findings certainly could help to establish the upper safe limits to be used in nanomedicine.

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) (“Nanotoxicologia ocupacional e ambiental: subsídios científicos para estabelecer marcos regulatórios e avaliação de riscos” - Proc. 552131/2011-3), DECIT/SCTIEMS through CNPq and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (Proc. FAPERGS 10/0036-5 – PRONEX) and by the FINEP research grant “Implantação, Modernização e Qualificação de Estrutura de Pesquisa da PUCRS” (PUCRSINFRA) # 01.11.0014-00. GMTO, TCBP, JWB and FLP were recipients of

fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). EMN was recipient of fellowship from Hewlett-Packard (TECNO PUC / PUCRS). LWK was recipient of fellowship from CNPq. CDB, NRSB, RMP and MRB are productivity research fellows from CNPq.

References

- Arbab AS, Wilson LB, Ashari P, Jordan EK, Lewis BK, Frank JA. A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR in Biomedicine*. John Wiley & Sons, Ltd.; 2005;18(6):383–9.
- Arenzana FJ, Clemente D, Sánchez-González R, Porteros Á, Aijón J, Arévalo R. Development of the cholinergic system in the brain and retina of the zebrafish. *Brain Research Bulletin*. 2005;66(4-6):421–5.
- Ashoka S, Peake BM, Bremner G, Hageman KJ, Reid MR. Comparison of digestion methods for ICP-MS determination of trace elements in fish tissues. *Analytica chimica acta*. Elsevier; 2009;653(2):191–9.
- Babes L, Denizot B, Tanguy G, Le Jeune JJ, Jallet P. Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Used as MRI Contrast Agents: A Parametric Study. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1999; 212(2):474–82.
- Babincova M, Babinec P, Bergemann C. High-gradient magnetic capture of ferrofluids: implications for drug targeting and tumor embolization. *Z Naturforsch C*. 2001/ed. 2001;56(9-10):909–11.
- Behra M, Cousin X, Bertrand C, Vonesch J-L, Biellmann D, Chatonnet A, et al. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nature Neuroscience*. 2002;10(2):846–53.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(1):464–74.
- Boehmler W, Obrecht-Pflumio S, Canfield V, Thisse C, Thisse B, Levenson R. Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. *Developmental dynamics an official publication of the American Association of Anatomists*. 2004;230(3):481–93.

- Bourrinet P, Bengel HH, Bonnemain B, Dencausse A, Idee J-M, Jacobs PM, et al. Preclinical Safety and Pharmacokinetic Profile of Ferumoxtran-10, an Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Magnetic Resonance Contrast Agent. *Investigative Radiology*. 2006;41(3).
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. Elsevier; 1976;72(1-2):248–54.
- Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Society of Powder Technology Japan; 2002;54(5):631–51.
- Chertok B, Moffat B a, David AE, Yu F, Bergemann C, Ross BD, et al. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials*. 2008;29(4):487–96.
- Clemente D, Porteros A, Weruaga E, Alonso JR, Arenzana FJ, Aijón J, et al. Cholinergic elements in the zebrafish central nervous system: Histochemical and immunohistochemical analysis. *Journal of Comparative Neurology*. 2004;474(1):75–107.
- Delgado L, Schmachtenberg O. Immunohistochemical localization of GABA, GAD65, and the receptor subunits GABAAalpha1 and GABAB1 in the zebrafish cerebellum. *Cerebellum London England*. 2008;7(3):444–50.
- 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 Jan;82(3):291–307.
- Edwards JG, Greig A, Sakata Y, Elkin D, Michel WC. Cholinergic innervation of the zebrafish olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*. John Wiley & Sons; 2007;504(2):279–92.
- Edwards JG, Michel WC. Odor-stimulated glutamatergic neurotransmission in the zebrafish olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*. Wiley Online Library; 2002;454(3):294–309.

- Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavello PR, Elegante MF, et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research*. 2009;205(1):38–44.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. Elsevier; 1961;7(2):88–95.
- Geraldes CFGC, Laurent S. Classification and basic properties of contrast agents for magnetic resonance imaging. *Contrast Media & Molecular Imaging*. John Wiley & Sons, Ltd.; 2009;4(1):1–23.
- 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. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2000;67(4):773–82.
- Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Current Opinion in Pharmacology*. 2004(5):504–12.
- Groman E V, Bouchard JC, Reinhardt CP, Vaccaro DE. Ultrasmall mixed ferrite colloids as multidimensional magnetic resonance imaging, cell labeling, and cell sorting agents. *Bioconjugate Chemistry*. 2007;18(6):1763–71.
- Grunwald DJ, Eisen JS. Headwaters of the zebrafish - emergence of a new model vertebrate. *Nature Reviews Genetics*. 2002;3(9):717–24.
- Gupta AK, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* . 2005;26(18):3995–4021.
- Gupta AK, Wells S. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *IEEE Transactions on NanoBioscience*. 2004;3(1):66–73.
- Hanini A, Schmitt A, Kacem K, Chau F, Ammar S, Gavard J. Evaluation of iron oxide nanoparticle biocompatibility. *International journal of nanomedicine*. 2011; 6:787–94.

- Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological sciences an official journal of the Society of Toxicology*. Soc Toxicology; 2005;86(1):6–19.
- Hood JD, Bednarski M, Frausto R, Guccione S, Reisfeld RA, Xiang R, et al. Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science (New York, N.Y.)*. 2002;296(5577):2404–7.
- Ito A, Honda H, Kobayashi T. Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of “heat-controlled necrosis” with heat shock protein expression. *Cancer immunology immunotherapy CII*. 2006;55(3):320–8.
- Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Elsevier; 2005;100(1):1–11.
- Jain TK, Reddy MK, Morales MA, Leslie-Pelecky DL, Labhasetwar V. Biodistribution, Clearance, and Biocompatibility of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles in Rats. *Molecular Pharmaceutics*. American Chemical Society; 2008;5(2):316–27.
- Kaslin J, Panula P. Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Comparative Neurology*. 2001 Wiley-Liss, Inc.; 2001;440(4):342–77.
- Kim Y-J, Nam R-H, Yoo YM, Lee C-J. Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neuroscience Letters*. 2004;355(1-2):29–32.
- 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. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*. Elsevier Inc.; 2012;155(2):247–52.
- Kumari M, Rajak S, Singh SP, Kumari SI, Kumar PU, Murty USN, et al. Repeated Oral Dose Toxicity of Iron Oxide Nanoparticles: Biochemical and Histopathological Alterations in Different Tissues of Rats. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. American Scientific Publishers; 2012 Mar 1 [cited 2013 Jun 26];12(3):2149–59.

- Kumari M, Rajak S, Singh SP, Murty USN, Mahboob M, Grover P, et al. Biochemical alterations induced by acute oral doses of iron oxide nanoparticles in Wistar rats. *Drug and chemical toxicology*. Informa Healthcare New York; 2013 Jul 30;36(3):296–305.
- Lacava ZGM, Azevedo RB, Martins E V, Lacava LM, Freitas MLL, Garcia VAP, et al. Biological effects of magnetic fluids: toxicity studies. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 1999;201(1–3):431–4.
- Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical reviews*. 2008;108(6):2064–110.
- Leising F, Chauvel B, Torres G. Process for the preparation of magnetizable microspheres based on polysiloxane and their biological application. US Patent 5,034,145. 1991.
- Lévy M, Lagarde F, Maraloiu V-A, Blanchin M-G, Gendron F, Wilhelm C, et al. Degradability of superparamagnetic nanoparticles in a model of intracellular environment: follow-up of magnetic, structural and chemical properties. *Nanotechnology*. 2010;21(39):395103.
- Li Z, Kawashita M, Araki N, Mitsumori M, Hiraoka M, Doi M. Magnetite nanoparticles with high heating efficiencies for application in the hyperthermia of cancer. *Materials Science and Engineering C*. Elsevier B.V.; 2010;30(7):990–6.
- Lillesaar C, Tannhäuser B, Stigloher C, Kremmer E, Bally-Cuif L. The serotonergic phenotype is acquired by converging genetic mechanisms within the zebrafish central nervous system. *Developmental dynamics an official publication of the American Association of Anatomists*. 2007;236(4):1072–84.
- Linney E, Upchurch L, Donerly S. Zebrafish as a neurotoxicological model. *Neurotoxicology and Teratology*. 2004;26(6):709–18.
- Low SE, Kuwada JY, Hume RI. Amino acid variations resulting in functional and nonfunctional zebrafish P2X(1) and P2X (5.1) receptors. *Purinergic Signalling*. Springer Netherlands; 2008;4(4):383–92.

- Lübbe AS, Bergemann C, Riess H, Schriever F, Reichardt P, Possinger K, et al. Clinical Experiences with Magnetic Drug Targeting: A Phase I Study with 4'-Epidoxorubicin in 14 Patients with Advanced Solid Tumors. *Cancer Research*. 1996;56 (20):4686–93.
- Mahmoudi M, Hofmann H, Rothen-Rutishauser B, Petri-Fink A. Assessing the in vitro and in vivo toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chemical reviews*. 2012;112(4):2323–38.
- Meng J, Fan J, Galiana G, Branca RT, Clasen PL, Ma S, et al. LHRH-functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for breast cancer targeting and contrast enhancement in MRI. *Materials Science and Engineering: C*. 2009;29(4):1467–79.
- Morales MP, Bomati-Miguel O, Alejo RP De, Ruiz-Cabello J, Veintemillas-Verdaguer S, Oâ I I I I Grady K. Contrast agents for MRI based on iron oxide nanoparticles prepared by laser pyrolysis. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2003;266(1-2):102–9.
- Namdeo M, Saxena S, Tankhiwale R, Bajpai M, Mohan YM, Bajpai SK. Magnetic nanoparticles for drug delivery applications. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2008;8(7):3247–71.
- Norton WHJ, Folchert A, Bally-Cuif L. Comparative analysis of serotonin receptor (HTR1A/HTR1B families) and transporter (slc6a4a/b) gene expression in the zebrafish brain. *Journal of Comparative Neurology*. 2008;511(4):521–42.
- Oliveira R da L, Seibt KJ, Rico EP, Bogo MR, Bonan CD. Inhibitory effect of lithium on nucleotide hydrolysis and acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Neurotoxicology and Teratology*. 2011 Nov;33(6):651–7.
- Patruta SI, Horl WH. Iron and infection. *Kidney International*. 1999;55(S69):S125–S130.
- Peng X-H, Qian X, Mao H, Wang AY, Chen ZG, Nie S, et al. Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy. *International journal of nanomedicine*. 2008 Jan ;3(3):311–21.
- Pereira VM, Bortolotto JW, Kist LW, Azevedo MB De, Fritsch RS, Oliveira RDL, et al. Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology*. 2012 ;33(3):469–75.

- Phelps HA, Runft DL, Neely MN. Adult Zebrafish Model of Streptococcal Infection. *Current Protocols in Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc.; 2005.
- Pouliquen D, Le Jeune JJ, Perdrisot R, Ermias A, Jallet P. Iron oxide nanoparticles for use as an MRI contrast agent: Pharmacokinetics and metabolism. *Magnetic Resonance Imaging*. 1991;9(3):275–83.
- Qiang Y, Antony J, Sharma A, Nutting J, Sikes D, Meyer D. Iron/iron oxide core-shell nanoclusters for biomedical applications. *Journal of Nanoparticle Research* . 2005;8(3-4):489–96.
- Raynal I, Prigent P, Peyramaure S, Najid A, Rebuzzi C, Corot C. Macrophage Endocytosis of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Mechanisms and Comparison of Ferumoxides and Ferumoxtran-10. *Investigative Radiology*. 2004;39(1).
- 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*. Elsevier B.V.; 2011;32(1):116–22.
- Rico EP, Rosemberg DB, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. *Toxicology Letters*. 2007;174(1-3):25–30.
- Rico EP, Rosemberg DB, Senger MR, Arizi MDB, Bernardi GF, Dias RD, et al. Methanol alters ecto-nucleotidases and acetylcholinesterase in zebrafish brain. *Neurotoxicology and Teratology*. 2006;28(4):489–96.
- Rico EP, Senger MR, Fauth MDG, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sciences*. 2003;73(16):2071–82.
- Rink E, Guo S. The too few mutant selectively affects subgroups of monoaminergic neurons in the zebrafish forebrain. *Neuroscience*. 2004;127(1):147–54.
- Russek-Blum N, Gutnick A, Nabel-Rosen H, Blechman J, Staudt N, Dorsky RI, et al. Dopaminergic neuronal cluster size is determined during early forebrain patterning. *Development Cambridge England*. 2008;135(20):3401–13.

- Ryu S, Holzschuh J, Mahler J, Driever W. Genetic analysis of dopaminergic system development in zebrafish. *Journal of neural transmission Supplementum*. 2006;(70):61–6.
- Schlachter EK, Widmer HR, Bregy A, Lönnfors-Weitzel T, Vajtai I, Corazza N, et al. Metabolic pathway and distribution of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: in vivo study. *International journal of nanomedicine*. 2011 Jan [cited 2013 Jun 12];6:1793–800.
- Senger MR, Rico EP, De Bem Arizi M, Frazzon APG, 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*. 2006;226(2-3):229–37.
- Senger MR, Rico EP, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Ecto-5'-nucleotidase activity in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative biochemistry and physiology Part B Biochemistry molecular biology*. 2004;139(2):203–7.
- Senger MR, Seibt KJ, Ghisleni GC, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Aluminum exposure alters behavioral parameters and increases acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Cell biology and toxicology*. 2011 ;27(3):199–205.
- Shen YF, Tang J, Nie ZH, Wang YD, Ren Y, Zuo L. Preparation and application of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles for wastewater purification. *Separation and Purification Technology*. 2009 Aug 25;68(3):312–9.
- Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*. 2001. p. 294–302.
- Sun C, Lee JSH, Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier; 2008;60(11):1252–65.
- Tabor R, Friedrich RW. Pharmacological Analysis of Ionotropic Glutamate Receptor Function in Neuronal Circuits of the Zebrafish Olfactory Bulb. Greene E, editor. *PLoS ONE* . Public Library of Science; 2008;3(1):17.

- 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 Biochimica et Biophysica Sinica*. 2007 May 1;39 (5):384–90.
- Tartaj P, Morales MADP, Veintemillas-Verdaguer S, González-Carre O T, Serna CJ. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*. IOP PUBLISHING LTD; 2003;36(13):R182–R197.
- Wahajuddin, Arora S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *International journal of nanomedicine*. 2012;7:3445–71.
- Wang L, Wang L, Ding W, Zhang F. Acute Toxicity of Ferric Oxide and Zinc Oxide Nanoparticles in Rats. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. American Scientific Publishers; 2010;10(12):8617–24.
- Wang YX, Hussain SM, Krestin GP. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *European Radiology*. SPRINGER-VERLAG; 2001;11(11):2319–31.
- Wunderbaldinger P, Josephson L, Weissleder R. Crosslinked iron oxides (CLIO): a new platform for the development of targeted MR contrast agents. *Academic radiology*. Center of Molecular Imaging Research, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Charlestown, MA 02129, USA.; 2002 Aug;9 Suppl 2:S304–6.
- Yen J, Donerly S, Levin ED, Linney EA. Differential acetylcholinesterase inhibition of chlorpyrifos, diazinon and parathion in larval zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*. 2011 Nov;33(6):735–41.
- Yu MK, Jeong YY, Park J, Park S, Kim JW, Min JJ, et al. Drug-loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined cancer imaging and therapy in vivo. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*. 2008;47(29):5362–5.
- Zhu X, Tian S, Cai Z. Toxicity assessment of iron oxide nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. Rockne K, editor. *PloS one*. Public Library of Science; 2012;7(9):e46286.

Figures

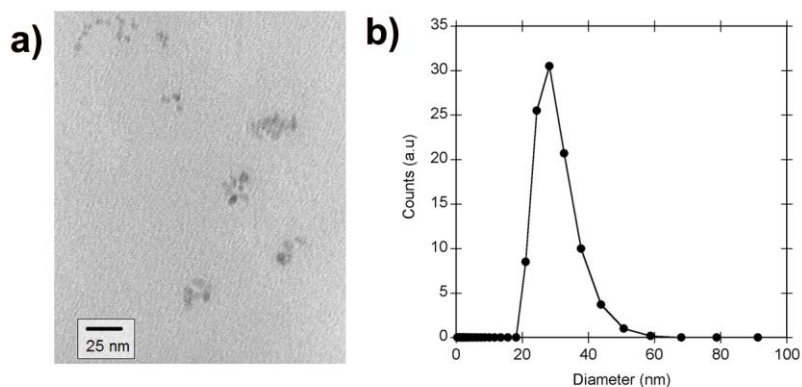


Figure 1a - Plan view TEM micrograph of the dried CLIO-NH₂ nanoparticles. **b** - Particle size distribution by number obtained by light scattering (Zetasizer) in diluted aqueous solution at room temperature.

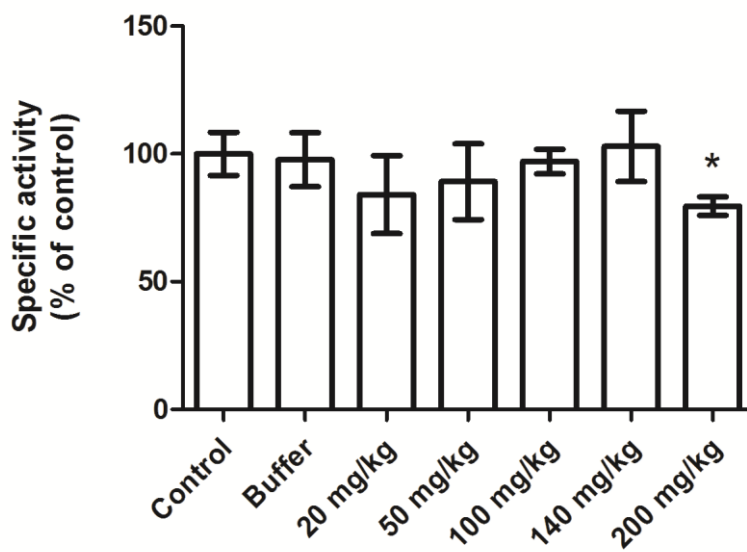


Figure 2 –*In vivo* effects of different concentrations of CLIO-NH₂ nanoparticles on ACh hydrolysis in zebrafish brain after 24h exposure. Bars represent the mean \pm S.E.M. The asterisk (*) indicates a significant difference compared to control and buffer control groups. Data analyzed statically by one-way ANOVA, followed by turkey multiple range test. $p \leq 0.05$ denote as significant difference from the control group.

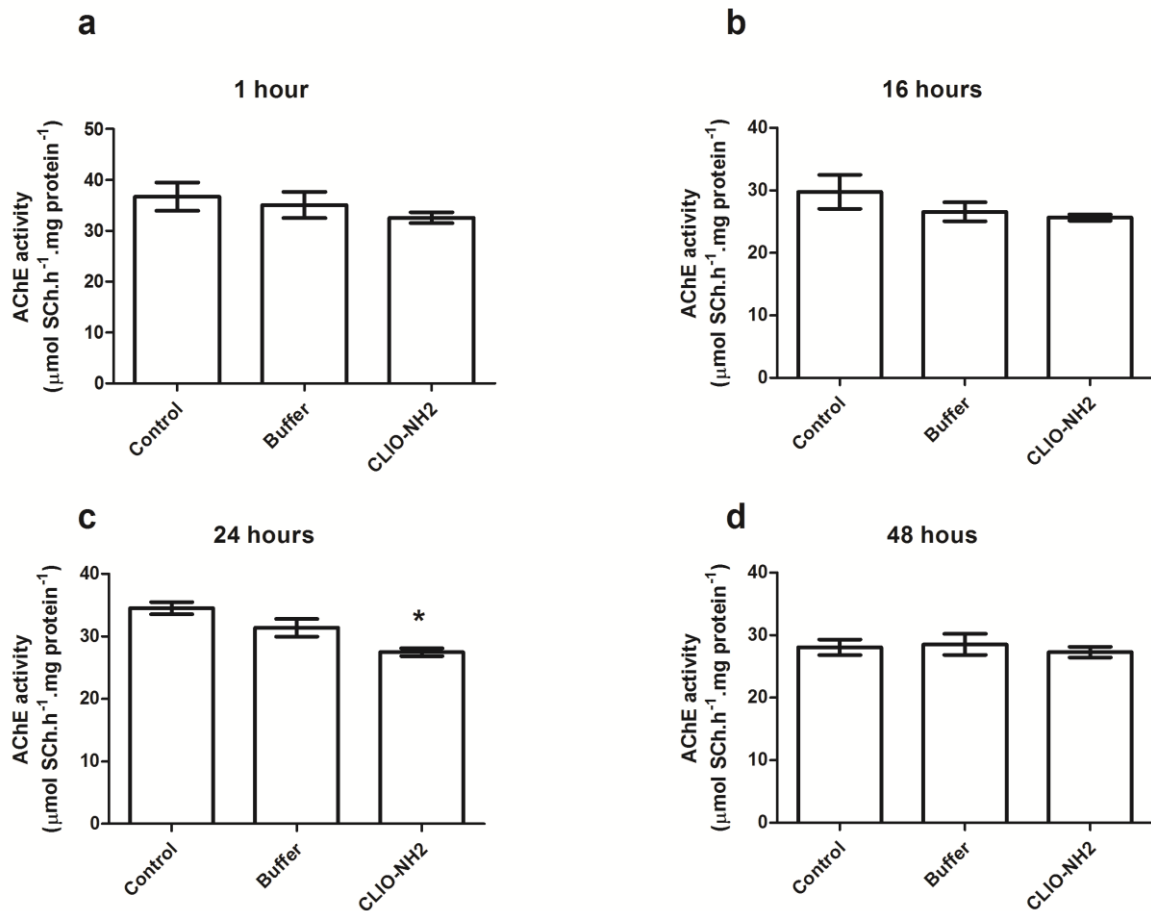


Figure 3 - *In vivo* effect of intraperitoneal injection of CLIO-NH₂ nanoparticles on zebrafish brain. **a** AChE activity one hour after the exposure ($36.7 \pm 2.77 \mu\text{mol SCh.h}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$; control values). **b** AChE activity 16 hours after the exposure ($29.8 \pm 2.72 \mu\text{mol SCh.h}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$; control values). **c** AChE activity 24 hours after the exposure ($34.52 \pm 0.952 \mu\text{mol SCh.h}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$; control values). **d** AChE activity 48 hours after the exposure ($28.1 \pm 1.26 \mu\text{mol SCh.h}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$; control values). *Bars* represent the mean \pm SEM, performed in quadruplicate. The AChE activity was expressed as μmol of thiocholine released per hour per milligram of protein. Data were analyzed statically by one-way ANOVA, followed by turkey multiple range test. $p \leq 0.05$ denote as significant difference from the control group.

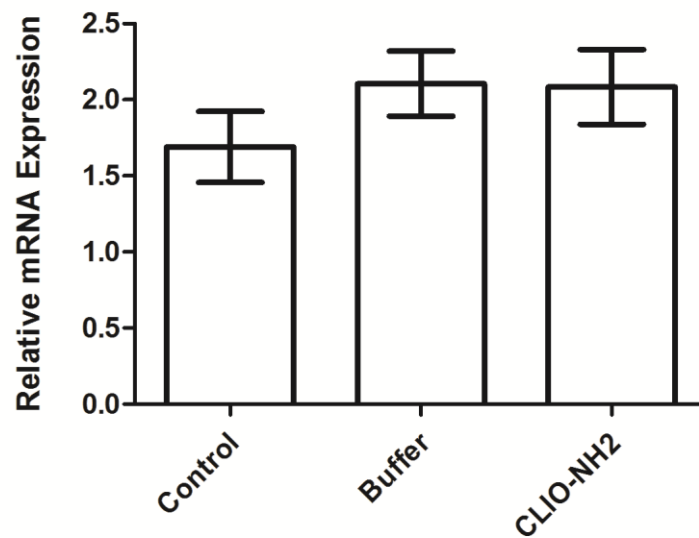


Figure 4 - RT-qPCR analysis. Relative *ache* mRNA expression on zebrafish brains 24 hours after CLIO-NH₂ nanoparticles exposure (200mg/Kg).

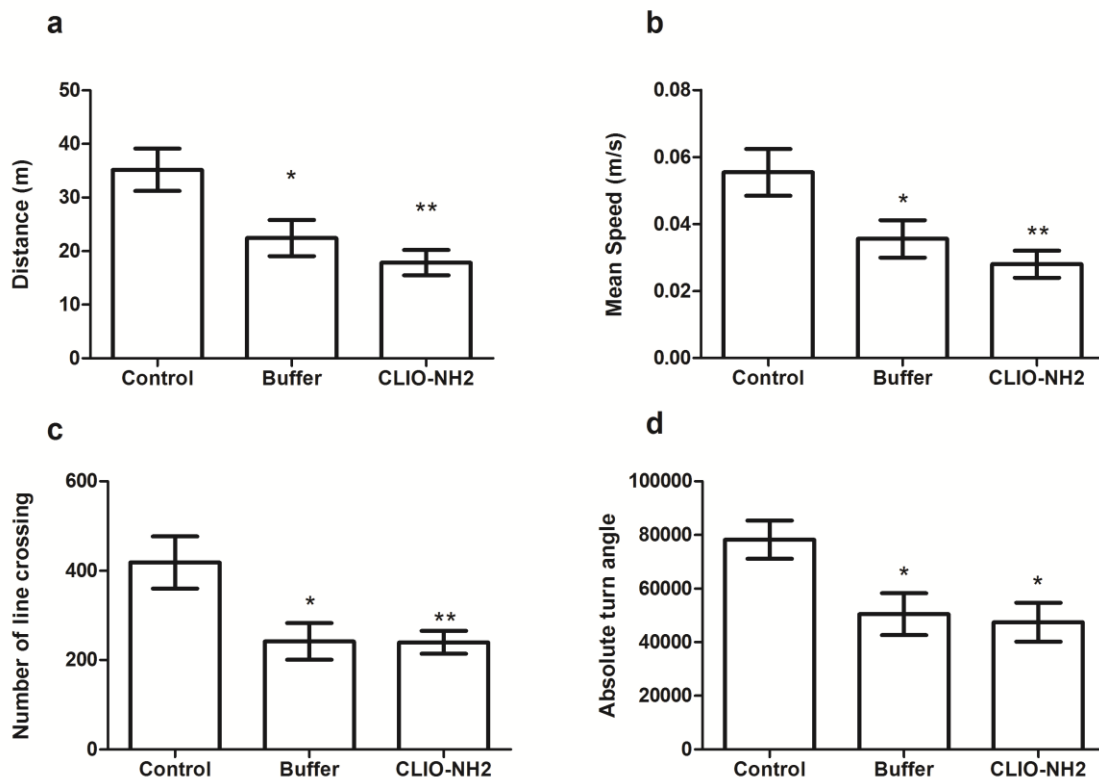


Figure 5 - Swimming performance. Effect of 24h exposure to 200 mg/Kg of CLIO-NH₂ nanoparticles on the distance traveled (a), mean speed (b), number of line crossings (c) and absolute turn angle (d) determined during 10 min of video recording in the tank-diving behavioral test. Bars represent the mean \pm S.E.M. The asterisk (*) indicates a significant difference compared to control group ($p \leq 0.05$).

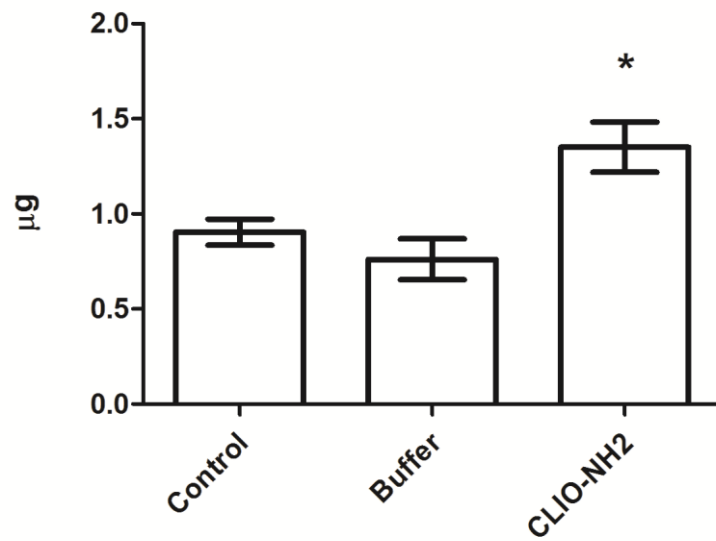


Figure 6 - Effect of CLIO-NH₂ nanoparticles exposure in zebrafish brain. The levels of iron in zebrafish brain are indicated in µg (pool of 3 brains per sample in triplicate). Bars represent the mean \pm S.E.M. The asterisk (*) indicates a significant difference compared to control group. Data analyzed statically by one-way ANOVA, followed by turkey multiple range test. $p \leq 0.05$ denote as significant difference from the control group.

Tables

Table 1 – Primers used in quantitative RT-qPCR.

Protein	Primer sequence (5' – 3')	Accession number
<i>EF1α</i> ^a	F – CTGGAGGCCAGCTCAAACAT R– ATCAAGAAGAGTAGTACCGCTAGCATTAC	NSDART00000023156
<i>Rpl13α</i> ^a	F – TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC R – AGACGCACAATCTTGAGAGCAG	NM_212784
<i>ache</i> ^b	F - GCTAATGAGCAAAAGCATGTGGGCTTG R - TATCTGTGATGTTAAGCAGACGAGGCAGG	NP_571921
<i>β-actin</i> ^b	F-CGAGCTGTCTTCCCATCCA R-TCACCAACGTAGCTGTCTTTCTG	ENSDART00000055194

^a According to Tang et al. (2007).

^b According to Pereira et al. (2012).

CAPÍTULO III

6	Discussão e perspectivas	73
7	Bibliografia	75

4 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

A partir da curva de concentração feita inicialmente foi possível determinar que apenas a dose mais elevada desta nanopartícula (200 mg/Kg) foi considerada tóxica em cérebro de zebrafish. As doses menos concentradas não modificaram a atividade da enzima. Esta toxicidade pode ser explicada pela geração de radicais livres, liberados a partir da oxidação do ferro livre acumulado no cérebro (Gaasch et al., 2007; Dorneles et al., 2009). Altas doses de ferro já foram reportadas no cérebro de pacientes com doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson (Smith et al., 1997; Hirsch et al., 1998 ; Berg et al., 2001), entretanto o mecanismo que causa este acúmulo de ferro ainda não é bem compreendido. Em relação à toxicidade com SPIONs, os estudos de Patruta e Horl (1999) confirmam nossa conclusão de que a resposta tóxica está relacionada à sobrecarga de ferro. Os mesmos resultados foram encontrados por Lubbe et al., (1996), onde toxicidade aparece apenas em pacientes tratados com doses mais elevadas de NPs ligadas a quimioterápicos.

Os resultados indicaram um alto nível de ferro livre nos cérebros de zebrafish tratados com nanopartículas de óxido de ferro dextran-aminadas (CLIO-NH₂) que conseqüentemente modularam a atividade da enzima AChE. Mudanças nesta enzima modificaram o comportamento locomotor de zebrafish, resultado ilustrado nos testes de velocidade, distância percorrida e “turn angle”. Neste mesmo teste foram analisados comportamento de ansiedade e “freezing”, mas nenhum grupo mostrou diferença em relação ao controle, indicando que o excesso de ferro no animal diminuiu sua locomoção, mas não ao ponto de cessar suas atividades.

Importante ressaltar que mesmo quando tratado com alta concentração de CLIO-NH₂ zebrafish mostrou sinais de toxicidade apenas em 24 horas pós-tratamento, voltando a sua atividade normal nas horas subsequentes (48 horas pós-tratamento). Isso pode indicar que a partir de 24 horas, o ferro livre encontrado no cérebro estaria sendo metabolizado e excretado

pelo organismo através das fezes e urina. A esta hipótese pode ter suporte na observação de que as fezes dos animais do grupo 48 horas apresentavam coloração acobreada. A excreção do ferro a partir de 48 horas sugere que o organismo do peixe consegue metabolizar a sobrecarga de ferro a partir do tratamento com SPION.

A partir dos nossos resultados podemos sugerir que baixas concentrações de CLIO-NH₂ são biocompatíveis e não mostram sinais de toxicidade ao cérebro, podendo ser utilizadas como veículos de outras drogas (“drug delivering”), agente de contraste ou outra função farmacológica relevante.

Mais estudos devem ser realizados com SPIONs associados a diferentes polímeros, não apenas ao dextran-aminado, considerando que o tipo de revestimento influencia no comportamento na nanopartícula (Gupta e Gupta, 2005; Wahajuddin e Arora, 2012). Realizar testes utilizando diferentes métodos para identificar citotoxicidade, genotoxicidade e inflamação, como RT² Profiler qPCR Array, RT-qPCR e histologia, são indispensáveis para uma maior compreensão sobre o metabolismo e toxicidade destas nanopartículas.

5 BIBLIOGRAFIA

ABRAMS, P. et al. Muscarinic receptors: their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. *British journal of pharmacology*, v. 148, n. 5, p. 565-578, 2006.

AIRHART, M. J. et al. Movement disorders and neurochemical changes in zebrafish larvae after bath exposure to fluoxetine (PROZAC). *Neurotoxicology and Teratology*, v. 29, n. 6, p. 652-664, 2007.

ANDERSON, K. V. e INGHAM, P. W. The transformation of the model organism: a decade of developmental genetics. *Nat Genetics*, n. 33, p. 285-293, 2003.

ARBAB, Ali S; *et al.* A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR in Biomedicine*, v. 18, n. 6, p. 383-389, 2005.

ARENZANA, F. J. et al. Development of the cholinergic system in the brain and retina of the zebrafish. *Brain Research Bulletin*, v. 66, n. 4-6, p. 421-425, 2005.

ASHARANI, P. V. et al. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*, v. 19, n. 25, p. 255102, 2008.

BABINCOVA, M.;; BABINEC, P. e BERGEMANN, C. High-gradient magnetic capture of ferrofluids: implications for drug targeting and tumor embolization. *Z Naturforsch C*, v. 56, n. 9-10, p. 909-911, 2001.

BAGHDOYAN, H. A. et al. Localization of muscarinic receptor subtypes in brain stem areas regulating sleep. *NeuroReport*, v. 5, n. 13, p. 1631-1634, 1994.

BAI, W. et al. Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 12, n. 5, p. 1645-1654, 2010.

BAILEY R.L., Lesser known applications of ferrofluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 39, n. 1–2, p. 178-182, 1983.

BAKER, C. et al. Synthesis and Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 5, n. 2, p. 244-249, 2005.

BARBAZUK, W. B. et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Research*, v. 10, n. 9, p. 1351-1358, 2000.

BEHRA, M. et al. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nature Neuroscience*, v. 10, n. 2, p. 846-853, 2002.

BERG, D et al. Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, v. 79, n. 2, p. 225-236, 2001.

BERRY, C. C. et al. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, v. 24, n. 25, p. 4551-4557, 2003.

BERTRAND, C 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. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 1, p. 464-474, 2001.

BLASER, R. e GERLAI, Robert. Behavioral phenotyping in zebrafish: comparison of three behavioral quantification methods. *Behavior Research Methods*, v. 38, n. 3, p. 456-469, 2006.

BOEHMLER, W. et al. Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. *Developmental dynamics an official publication of the American Association of Anatomists*, v. 230, n. 3, p. 481-493, 2004.

BONNEMAIN, B. Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: physicochemical characteristics and clinical applications. A review. *Journal of Drug Targeting*, v. 6, n. 3, p. 167-174, 1998.

BOURRINET, P. et al. Preclinical Safety and Pharmacokinetic Profile of Ferumoxtran-10, an Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Magnetic Resonance Contrast Agent. *Investigative Radiology* v 41, n3, 2006.

BRADFORD, H. *Chemical neurobiology: an introduction to neurochemistry*. New York, v. 99, 1986.

BRAYDICH-STOLLE, L. et al. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological Sciences*, v. 88, n. 2, p. 412-419, 2005.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C. e COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, n. 5, p. 631-51, 2002.

BROUGHTON, R. E.; MILAM, J. E. e ROE, B. A. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA. *Genome Research*, v. 11, n. 11, p. 1958-1967, 2001.

CAULFIELD, M. P. e BIRDSALL, N. J. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacological Reviews*, v. 50, n. 2, p. 279-290, 1998.

CHARLES, SW e POPPLEWELL, J. Ferromagnetic liquids. *Handbook of Ferromagnetic Materials*. Elsevier, 1980. v. 2p. 509–559.

CIOFFI, Nicola et al. Copper Nanoparticle/Polymer Composites with Antifungal and Bacteriostatic Properties. *Chemistry of Materials*, v. 17, n. 21, p. 5255-5262, 2005.

CLEMENTE, D. et al. Comparative analysis of the distribution of choline acetyltransferase in the central nervous system of cyprinids. *Brain Research Bulletin*, v. 66, n. 4-6, p. 546-549, 2005.

CLEMENTE, D. et al. Cholinergic elements in the zebrafish central nervous system: Histochemical and immunohistochemical analysis. *Journal of Comparative Neurology*, v. 474, n. 1, p. 75-107, 2004.

COLWILL, R. M. et al. Visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Processes*, v. 70, n. 1, p. 19-31, 2005.

COOPER, J R.; BLOOM, F. E. e ROTH, R. H. *The biochemical basis of neuropharmacology, 7th Edition*. New York, NY, US: Oxford University Press, v. 30, p. 518, 2005.

CRICHTON, R. R. et al. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 91, n. 1, p. 9-18, 2002.

CUMMINGS, J. L. e BACK, C. The cholinergic hypothesis of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *The American journal of geriatric psychiatry: official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry*, v. 6, n. 2 Suppl 1, p. S64-78, 1998.

CZUPRYNA, J. e TSOURKAS, A. Suicide gene delivery by calcium phosphate nanoparticles: a novel method of targeted therapy for gastric cancer. *Cancer biology therapy*, v. 5, n. 12, p. 1691-1692, 2006.

DELFINO, R. T.; RIBEIRO, T. S. e FIGUEROA-VILLAR, J. D. Organophosphorus compounds as chemical warfare agents: a review. *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 3, p. 407-428, 2009.

DELGADO, L. e SCHMACHTENBERG, O. Immunohistochemical localization of GABA, GAD65, and the receptor subunits GABAA α 1 and GABAB1 in the zebrafish cerebellum. *Cerebellum London England*, v. 7, n. 3, p. 444-50, 2008.

DENIZOT, B. et al. Phosphorylcholine Coating of Iron Oxide Nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 209, n. 1, p. 66-71, 1999.

DIEGUES, TG, M. FELINTO, RL CAMILO, M. YAMAMURA, LC SAMPAIO, and G. B. Síntese E Caracterização De Nanopartículas Magnéticas De Ferrita De Manganês Dopadas Com Eu³⁺. *17º CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais*, p. 3450-3461, 2006.

DODD, A. et al. Zebrafish: bridging the gap between development and disease. *Human Molecular Genetics*, v. 9, n. 16, p. 2443-2449, 2000.

DONG, W. 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. *Toxicological sciences an official journal of the Society of Toxicology*, v. 69, n. 1, p. 191-201, 2002.

DOOLEY, K. e ZON, L I. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current opinion in genetics development*, v. 10, n. 3, p. 252-256, 2000.

DORNELLES, Arethuza S; et al. mRNA expression of proteins involved in iron homeostasis in brain regions is altered by age and by iron overloading in the neonatal period. *Neurochemical research*, v. 35, n. 4, p. 564-71, 2010.

DRESCO, P. A. et al. Preparation and Properties of Magnetite and Polymer Magnetite Nanoparticles. *Langmuir*, v. 15, n. 6, p. 1945-1951, 1999.

EDWARDS, J. G. e MICHEL, W. C. Odor-stimulated glutamatergic neurotransmission in the zebrafish olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*, v. 454, n. 3, p. 294-309, 2002.

EDWARDS, J. G. et al. Cholinergic innervation of the zebrafish olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*, v. 504, n. 2, p. 279-292, 2007.

EMRAN, F.;; RIHEL, J. e DOWLING, J. E. A behavioral assay to measure responsiveness of zebrafish to changes in light intensities. *Journal of visualized experiments JoVE*. 2008.

FAKO, V. E. e FURGESON, D. Y. Zebrafish as a correlative and predictive model for assessing biomaterial nanotoxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 61, n. 6, p. 478-486, 2009.

FERNANDEZ, H. L. e HODGES-SAVOLA, C. A. Trophic regulation of acetylcholinesterase isoenzymes in adult mammalian skeletal muscles. *Neurochemical Research*, v. 17, n. 1, p. 115-124, 1992.

FREEMAN MW, et al. Magnetism in medicine. *J Appl Phys.* v31, S404, 1960.

GERLAI, R et al. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 67, n. 4, p. 773-782, 2000.

GERLAI, Robert. Zebra fish: an uncharted behavior genetic model. *Behavior Genetics*, v. 33, n. 5, p. 461-468, 2003.

GILCHRIST, R. K. et al. Selective inductive heating of lymph nodes. *Annals of Surgery*, v. 146, n. 4, p. 596-606, 1957.

GONÇALVES, M. et al. Synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles supported on carbon matrix: oxidation of the dye methylene blue in water. *Quimica Nova*, v. 32, n. 7, p. 1723–1726, 2009.

GRIFFITT, R. J. et al. Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. *Toxicological sciences an official journal of the Society of Toxicology*, v. 107, n. 2, p. 404-415, 2009.

GROMAN, E. V. et al. Ultrasmall mixed ferrite colloids as multidimensional magnetic resonance imaging, cell labeling, and cell sorting agents. *Bioconjugate Chemistry*, v. 18, n. 6, p. 1763-1771, 2007.

GRUNWALD, D. J. e EISEN, J. S. Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate. *Nature Reviews Genetics*, v. 3, n. 9, p. 717-724, 2002.

GUO, S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes brain and behavior*, v. 3, n. 2, p. 63-74, 2004.

GUPTA, A. K. e GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, 2005.

GUPTA, A. K. e WELLS, S. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. *IEEE Transactions on NanoBioscience*, v. 3, n. 1, p. 66-73, 2004.

HÄFELI, Urs O., and Gayle J. Pauer. In Vitro and in Vivo Toxicity of Magnetic Microspheres. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. v. 194, n. 1-3, p. 76-82, 1999.

HAMLEY, I. W. Nanotechnology with soft materials. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 42, n. 15, p. 1692-1712, 2003.

HILL, A. J. et al. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological sciences an official journal of the Society of Toxicology*, v. 86, n. 1, p. 6-19, 2005.

HILL, A. et al. Neurodevelopmental defects in zebrafish (*Danio rerio*) at environmentally relevant dioxin (TCDD) concentrations. *Toxicological sciences an official journal of the Society of Toxicology*, v. 76, n. 2, p. 392-399, 2003.

HIRSCH, E C et al. Iron and Aluminum Increase in the Substantia Nigra of Patients with Parkinson's Disease: An X-Ray Microanalysis. *Journal of Neurochemistry*, v. 56, n. 2, p. 446-451, 1991.

HOFFBRAND AV, et al. Hypochromic anaemias and iron overload. *Essential Haematology*. 5th ed. Oxford (UK): Blackwell Publishing; n 3, ; p. 28-43, 2006.

HUSSAIN, S. M. et al. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro an international journal published in association with BIBRA*, v. 19, n. 7, p. 975-983, 2005.

IMERI, L. et al. Selective blockade of different brain stem muscarinic receptor subtypes: effects on the sleep-wake cycle. *Brain Research*, v. 636, n. 1, p. 68-72, 1994.

ITO, A.; HONDA, H. e KOBAYASHI, T. Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of "heat-controlled necrosis" with heat shock protein expression. *Cancer immunology immunotherapy CII*, v. 55, n. 3, p. 320-328, 2006.

ITO, A. et al. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 100, n. 1, p. 1-11, 2005.

JIN, Sha e YE, K. Nanoparticle-mediated drug delivery and gene therapy. *Biotechnology Progress*, v. 23, n. 1, p. 32-41, 2007.

JONES, S;; SUDWEEKS, S. e YAKEL, J. L. Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function. *Trends in Neurosciences*, v. 22, n. 12, p. 555-561, 1999.

JÚNIOR, W. B. Nanopartículas magnéticas metálicas recobertas com óxido de ferro: intensificação das propriedades magnéticas da nanopartícula e funcionalização para aplicação em biomedicina. 2011. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

KAPCZINSKI, FLÁVIO, JÓAO QUEVEDO, and I. O. I. *Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos*. Porto Alegre, RS, Brasil: Artmed, p. 272, 2000.

KARLIN, A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 3, n. 2, p. 102-114, 2002.

KARLSSON, H. L. et al. Size-dependent toxicity of metal oxide particles--a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicology Letters*, v. 188, n. 2, p. 112-118, 2009.

KASLIN, J e PANULA, P. Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Comparative Neurology*, v. 440, n. 4, p. 342-377, 2001.

KASLIN, Jan et al. The orexin/hypocretin system in zebrafish is connected to the aminergic and cholinergic systems. *Journal of Neuroscience*, v. 24, n. 11, p. 2678-2689, 2004.

KIM, D K et al. Energy absorption of superparamagnetic iron oxide nanoparticles by microwave irradiation. *Journal of Applied Physics*, v. 97, n. 10, p. 10J510-10J510-3, 2005.

KIM, J. S. et al. Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicological sciences an official journal of the Society of Toxicology*, v. 89, n. 1, p. 338-347, 2006.

KIM, Y.-J. et al. Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neuroscience Letters*, v. 355, n. 1-2, p. 29-32, 2004.

KIMMEL, C. B. e WARGA, R. M. Cell lineage and developmental potential of cells in the zebrafish embryo. *Trends in Genetics*, v. 4, n. 3, p. 68-74, 1988.

KIMMEL, C. B. Genetics and early development of zebrafish. *Trends in Genetics*, v. 5, n. 8, p. 283-288, 1989.

KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics an official publication of the American Association of Anatomists*, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

KIST, Luiza Wilges et al. Microcystin-LR acute exposure increases AChE activity via transcriptional ache activation in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, v. 155, n. 2, p. 247-52, 2012.

KUCHIBHATLA, S. V.;; KARAKOTI, A. S. e SEAL, S. Colloidal stability by surface modification. *Jom*, v. 57, n. 12, p. 52-56, 2005.

LACAVA, Z. G. M. et al. Biological effects of magnetic fluids: toxicity studies. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 201, n. 1-3, p. 431-434, 1999.

LEISING, F.; CHAUVEL, B. e TORRES, G. *Process for the preparation of magnetizable microspheres based on polysiloxane and their biological application*. US Patents 5.034.145, 1991.

LELE, Z. e KRONE, P. H. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnology Advances*, v. 14, n. 1, p. 57-72, 1996.

LÉVY, M et al. Degradability of Superparamagnetic Nanoparticles in a Model of Intracellular Environment: Follow-up of Magnetic, Structural and Chemical Properties. *Nanotechnology* v 21,n.39 p 395103. 2010.

LEVIN, E. D. e CHEN, E. Nicotinic involvement in memory function in zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 26, n. 6, p. 731-735, 2004.

LEVIN, E. D. et al. Developmental chlorpyrifos effects on hatchling zebrafish swimming behavior. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 26, n. 6, p. 719-723, 2004.

LI, B. et al. Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse. *Journal of Neurochemistry*, v. 75, n. 3, p. 1320-1331, 2000.

LI, J. K.; WANG, N. e WU, X. S. A novel biodegradable system based on gelatin nanoparticles and poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres for protein and peptide drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 86, n. 8, p. 891-895, 1997.

LI, Z. et al. Magnetite nanoparticles with high heating efficiencies for application in the hyperthermia of cancer. *Materials Science and Engineering C*, v. 30, n. 7, p. 990-996, 2010.

LIESCHKE, G. J. e CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*, v. 8, n. 5, p. 353-367, 2007.

LILLESAAR, C. et al. The serotonergic phenotype is acquired by converging genetic mechanisms within the zebrafish central nervous system. *Developmental dynamics an official publication of the American Association of Anatomists*, v. 236, n. 4, p. 1072-1084, 2007.

LIU, W. et al. In vivo MRI using positive-contrast techniques in detection of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *NMR in Biomedicine*, v. 21, n. 3, p. 242-250, 2008.

LIU, Y. et al. Attapulgitite-Fe₃O₄ magnetic nanoparticles via co-precipitation technique. *Applied Surface Science*, v. 255, n. 5, p. 2020-2025, 2008.

LIU, Zhe;; KIESSLING, F. e GÄTJENS, J. Advanced Nanomaterials in Multimodal Imaging: Design, Functionalization, and Biomedical Applications. *Journal of Nanomaterials*, v. 2010, n. 6, p. 1-15, 2010.

LOW, S. E.;; KUWADA, J. Y. e HUME, R. I. Amino acid variations resulting in functional and nonfunctional zebrafish P2X(1) and P2X (5.1) receptors. *Purinergic Signalling*, v. 4, n. 4, p. 383-392, 2008.

LÓPEZ PÉREZ, J. A. et al. Advances in the Preparation of Magnetic Nanoparticles by the Microemulsion Method. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 101, n. 41, p. 8045-8047, 1997.

LÜBBE, Andreas Stephan; BERGEMANN, Christian; RIESS, Hanno et al. Clinical Experiences with Magnetic Drug Targeting: A Phase I Study with 4'-Epidoxorubicin in 14 Patients with Advanced Solid Tumors. *Cancer Research*, v. 56, n. 20, p. 4686-4693, 1996.

MASSIA, S. P.; STARK, J. e LETBETTER, D. S. Surface-immobilized dextran limits cell adhesion and spreading. *Biomaterials*, v. 21, n. 22, p. 2253-2261, 2000.

MILATOVIC, D. e DETTBARN, W. D. Modification of acetylcholinesterase during adaptation to chronic, subacute paraoxon application in rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 136, n. 1, p. 20-28, 1996.

MILLAR, N. S. e GOTTI, C. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology*, v. 56, n. 1, p. 237-246, 2009.

MILLER, N. e GERLAI, Robert. Quantification of shoaling behaviour in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, v. 184, n. 2, p. 157-166, 2007.

MORALES, M. P. et al. Contrast agents for MRI based on iron oxide nanoparticles prepared by laser pyrolysis. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 266, n. 1-2, p. 102-109, 2003.

MUELLER, T.;; VERNIER, P. e WULLIMANN, M. F. The adult central nervous cholinergic system of a neurogenetic model animal, the zebrafish *Danio rerio*. *Brain Research*, v. 1011, n. 2, p. 156-169, 2004.

NAMDEO, M. et al. Magnetic nanoparticles for drug delivery applications. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 8, n. 7, p. 3247-3271, 2008.

NEDKOV, I. et al. Surface oxidation, size and shape of nano-sized magnetite obtained by co-precipitation. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 300, n. 2, p. 358-367, 2006.

NORTON, W. H. J.;; FOLCHERT, A. e BALLY-CUIF, L. Comparative analysis of serotonin receptor (HTR1A/HTR1B families) and transporter (slc6a4a/b) gene expression in the zebrafish brain. *Journal of Comparative Neurology*, v. 511, n. 4, p. 521-542, 2008.

NORTON, W. e BALLY-CUIF, L. Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. *BMC Neuroscience*, v. 11, n. 1, p. 90, 2010.

PANKHURST, Q. et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 36, n. 13, p. R167-R181, 2003.

PANULA, P et al. The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiology of Disease*, v. 40, n. 1, p. 46-57, 2010.

PARK, J. et al. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nature Materials*, v. 3, n. 12, p. 891-895, 2004.

PARK, S. et al. Cellular toxicity of various inhalable metal nanoparticles on human alveolar epithelial cells. *Inhalation Toxicology*, v. 19 Suppl 1, n. 786944179, p. 59-65, 2007.

PARNG, C. et al. Neurotoxicity assessment using zebrafish. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 55, n. 1, p. 103-112, 2007.

PARNG, C. et al. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay And Drug Development Technologies*, v. 1, n. 1 Pt 1, p. 41-48, 2002.

PATERSON, D. e NORDBERG, A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Progress in Neurobiology*, v. 61, n. 1, p. 75-111, 2000.

PATRUTA, SANDA I; HORL, WALTER H. Iron and infection. *Kidney International*, v. 55, n. S69, p. S125-S130, 1999.

PEREIRA, V et al. Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology*, v. 33, n. 3, p. 469-75, 2012.

PERUGINI, P. et al. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 246, n. 1-2, p. 37-45, 2002.

PISANIC, T. R. et al. Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. *Biomaterials*, v. 28, n. 16, p. 2572-2581, 2007.

POSTLETHWAIT, J H et al. Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nature Genetics*, v. 18, n. 4, p. 345-349, 1998.

POWERS, C. M. et al. Silver exposure in developing zebrafish produces persistent synaptic and behavioral changes. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 33, n. 2, p. 329-332, 2011.

PROW, T. et al. Nanoparticle tethered biosensors for autoregulated gene therapy in hyperoxic endothelium. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, v. 2, n. 4, p. 276, 2006.

QIANG, Y. et al. Iron/iron oxide core-shell nanoclusters for biomedical applications. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 8, n. 3-4, p. 489-496, 2005.

QIU, J.-D. et al. Synthesis and characterization of ferrocene modified Fe₃O₄@Au magnetic nanoparticles and its application. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, n. 8, p. 2649-2653, 2009.

QUINN, D. M. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews*, v. 87, n. 5, p. 955-979, 1987.

RAJU, H. B. et al. Evaluation of Magnetic Micro- and Nanoparticle Toxicity to Ocular Tissues. *PLoS ONE*, v. 6, n. 5, p. 11, 2011.

RAKONCZAY, Z. et al. Peripheral cholinergic disturbances in Alzheimer's disease. *Chemicobiological interactions*, v. 157-158, p. 233-238, 2005.

RICHETTI, S. K. et al. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *NeuroToxicology*, v. 32, n. 1, p. 116-122, 2011.

RICO, E P et al. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicology and Teratology*, 2011.

RICO, Eduardo Pacheco et al. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. *Toxicology Letters*, v. 174, n. 1-3, p. 25-30, 2007.

RICO, Eduardo Pacheco et al. Methanol alters ecto-nucleotidases and acetylcholinesterase in zebrafish brain. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 28, n. 4, p. 489-496, 2006.

RICO, Eduardo Pacheco et al. Ethanol and acetaldehyde alter NTPDase and 5'-nucleotidase from zebrafish brain membranes. *Neurochemistry International*, v. 52, n. 1-2, p. 290-296, 2008.

RICO, Eduardo Pacheco et al. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sciences*, v. 73, n. 16, p. 2071-2082, 2003.

RINK, E. e GUO, S. The too few mutant selectively affects subgroups of monoaminergic neurons in the zebrafish forebrain. *Neuroscience*, v. 127, n. 1, p. 147-154, 2004.

RISHTON, S. A. et al. Magnetic tunnel junctions fabricated at tenth-micron dimensions by electron beam lithography. *Microelectronic Engineering*, v. 35, n. 1-4, p. 249-252, doi:10.1016/S0167-9317(96)00107-4, 1997.

ROEX, E. W. M.;; KEIJZERS, R. e GESTEL, C. A. M. VAN. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquatic toxicology Amsterdam Netherlands*, v. 64, n. 4, p. 451-460, 2003.

ROSEMBERG, Denis Broock et al. Acute and subchronic copper treatments alter extracellular nucleotide hydrolysis in zebrafish brain membranes. *Toxicology*, v. 236, n. 1-2, p. 132-139, 2007.

RUSSEK-BLUM, N. et al. Dopaminergic neuronal cluster size is determined during early forebrain patterning. *Development Cambridge England*, v. 135, n. 20, p. 3401-3413, 2008.

RYU, S. et al. Genetic analysis of dopaminergic system development in zebrafish. *Journal of neural transmission Supplementum*, n. 70, p. 61-66, 2006.

SAFARÍK, I.; SAFARÍKOVÁ, M. e FORSYTHE, S. J. The application of magnetic separations in applied microbiology. *The Journal of applied bacteriology*, v. 78, n. 6, p. 575-585, 1995.

SANTOS, E. M. et al. Identifying health impacts of exposure to copper using transcriptomics and metabolomics in a fish model. *Environmental science technology*, v. 44, n. 2, p. 820-826, 2010.

SANT'ANNA, M. C. B. et al. Iron exposure modifies acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*) tissues: distinct susceptibility of tissues to iron overload. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 37, n. 3, p. 573-581, 2011.

SARTER, M. e PARIKH, V. Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 6, n. 1, p. 48-56, 2005.

SAWAI, J. et al. Effect of Particle Size and Heating Temperature of Ceramic Powders on Antibacterial Activity of Their Slurries. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, v. 29, n. 2, p. 251-256, 1996.

SCHMIDT, A. M. Thermoresponsive magnetic colloids. *Colloid and Polymer Science*, v. 285, n. 9, p. 953-966, doi:10.1007/s00396-007-1667-z, 2007.

SCHÜTT, W. et al. Biocompatible magnetic polymer carriers for in vivo radionuclide delivery. *Artificial Organs*, v. 23, n. 1, p. 98-103, 1999.

SCHWICK, H. G. e HEIDE, K. Immunochemistry and immunology of collagen and gelatin. *Bibliotheca Haematologica*, v. 33, p. 111-125, 1969.

SCREMIN, O. U. et al. Cholinesterase inhibition improves blood flow in the ischemic cerebral cortex. *Brain Research Bulletin*, v. 42, n. 1, p. 59-70, 1997.

SENGER, M. R. et al. Exposure to Hg²⁺ and Pb²⁺ changes NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in central nervous system of zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology*, v. 226, n. 2-3, p. 229-237, 2006.

SENGER, M. R. et al. Carbofuran and malathion inhibit nucleotide hydrolysis in zebrafish (*Danio rerio*) brain membranes. *Toxicology*, v. 212, n. 2-3, p. 107-115, 2005.

SENGER, M. R. et al. Ecto-5'-nucleotidase activity in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative biochemistry and physiology Part B Biochemistry molecular biology*, v. 139, n. 2, p. 203-207, 2004.

SENGER, M. R. et al. In vitro effect of zinc and cadmium on acetylcholinesterase and ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Toxicology in vitro an international journal published in association with BIBRA*, v. 20, n. 6, p. 954-958, 2006.

SERRA, E. L.;; MEDALHA, C. C. e MATTIOLI, R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Brazilian journal of medical and biological research*, v. 32, n. 12, p. 1551-1553, 1999.

SIEGEL, G., R.W. Alberts, S. T. Brady, and D. L. Price. *Basic neurochemistry: molecular, cellular, and medical aspects*. 7. ed. Califórnia: Elsevier Academic press, 2006. p. 992

SMITH, Mark A; HARRIS, Peggy L R; SAYRE, Lawrence Met al. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , v. 94 , n. 18 , p. 9866-9868, 1997.

SOREQ, H. e SEIDMAN, S. *Acetylcholinesterase--new roles for an old actor*. *Nature Reviews Neuroscience.*, v. 2, n. 4, p. 294-302, 2001.

SPENCE, R. et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, v. 83, n. 1, p. 13-34, 2008.

SPRAGUE, J et al. The Zebrafish Information Network (ZFIN): a resource for genetic, genomic and developmental research. *Nucleic Acids Research*, v. 29, n. 1, p. 87-90, 2001.

SPRAGUE, Judy et al. The Zebrafish Information Network: the zebrafish model organism database provides expanded support for genotypes and phenotypes. *Nucleic Acids Research*, v. 36, p. D768-D772, 2008.

STERN, H. M. e ZON, Leonard I. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nature Reviews Cancer*, v. 3, n. 7, p. 533-539, 2003.

SUKARDI, H. et al. Incorporating zebrafish omics into chemical biology and toxicology. *Zebrafish*, v. 7, n. 1, p. 41-52, 2010.

SUN, C.;; LEE, J. S. H. e ZHANG, M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, n. 11, p. 1252-1265, 2008.

SUSSMAN, J. L. et al. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, v. 253, n. 5022, p. 872-879, 1991.

SWAIN, H. A.;; SIGSTAD, C. e SCALZO, F. M. Effects of dizocilpine (MK-801) on circling behavior, swimming activity, and place preference in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology and Teratology*, v. 26, n. 6, p. 725-729, 2004.

TABOR, R. e FRIEDRICH, R. W. Pharmacological Analysis of Ionotropic Glutamate Receptor Function in Neuronal Circuits of the Zebrafish Olfactory Bulb. *PLoS ONE*, v. 3, n. 1, p. 17, 2008.

TANG, S. et al. Ultrasonic electrodeposition of silver nanoparticles on dielectric silica spheres. *Electrophoresis*, v. 29, n. 29, p. 295607, 2007.

TARTAJ, P. et al. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 36, n. 13, p. R182-R197, 2003.

UCHIYAMA, T. e CHESS-WILLIAMS, R. Muscarinic receptor subtypes of the bladder and gastrointestinal tract. *Journal of smooth muscle research Nihon Heikatsukin Gakkai kikanishi*, v. 40, n. 6, p. 237-247, 2004.

VASCOTTO, S. G.; BECKHAM, Y. e KELLY, G. M. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochemistry and cell biology Biochimie et biologie cellulaire*, v. 75, n. 5, p. 479-485, 1997.

VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S. Iron ultrafine nanoparticles prepared by aerosol laser pyrolysis. *Materials Letters*, v. 57, n. 5-6, p. 1184-1189, 2003.

VENTURA, A. L. M. et al. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo. *Revista de Psiquiatria Clínica*, v. 37, n. 2, 2010.

VERANTH, J. M. et al. Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Particle and Fibre Toxicology*, v. 4, p. 2, 2007.

WAHAJUDDIN; ARORA, Sumit. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *International journal of nanomedicine*, v. 7, p. 3445-71, 2012.

WANG, Y. X.; HUSSAIN, S. M. e KRESTIN, G. P. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *European Radiology*, v. 11, n. 11, p. 2319-2331, 2001.

WARGA, R. M. e KIMMEL, C. B. Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish. *Development Cambridge England*, v. 108, n. 4, p. 569-80, 1990.

WARHEIT, D. B. et al. Pulmonary bioassay studies with nanoscale and fine-quartz particles in rats: toxicity is not dependent upon particle size but on surface characteristics. *Toxicological sciences an official journal of the Society of Toxicology*, v. 95, n. 1, p. 270-280, 2007.

WARHEIT, D. B. et al. Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. *Toxicological sciences an official journal of the Society of Toxicology*, v. 91, n. 1, p. 227-236, 2006.

WEI, C. et al. Bactericidal Activity of TiO₂ Photocatalyst in Aqueous Media: Toward a Solar-Assisted Water Disinfection System. *Environmental Science & Technology*, v. 28, n. 5, p. 934-938, 1994.

WESTERFIELD, M. *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. [S.l.]: University of Oregon Press, 2000. p. 335

WOODS, I. G. et al. A Comparative Map of the Zebrafish Genome. *Genome Research*, v. 10, n. 12, p. 1903-1914, 2000.

ZAITSEV, V. S. et al. Physical and Chemical Properties of Magnetite and Magnetite-Polymer Nanoparticles and Their Colloidal Dispersions. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 212, n. 1, p. 49-57, 1999.

ZHANG, C. et al. Recent development and application of magnetic nanoparticles for cell labeling and imaging. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 10, n. 3, p. 193-202, 2010.

ZHU, X. et al. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *Journal of environmental science and health Part A Toxic hazardous substances environmental engineering*, v. 43, n. 3, p. 278-284, 2008.

ZIRGER, J. M. et al. Cloning and expression of zebrafish neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Gene expression patterns*, v. 3, n. 6, p. 747-754, 2003.

ANEXO I

-----Mensagem original-----

De: ees_neutox.0.224e43.26f70550@eesmail.elsevier.com [mailto:ees_neutox.0.224e43.26f70550@eesmail.elsevier.com] Em nome de NeuroToxicology

Enviada em: quarta-feira, 3 de julho de 2013 16:44

Para: Mauricio Reis Bogo

Assunto: Submission Confirmation

Dear Dr. Mauricio Reis Bogo,

Your submission entitled "Transient modulation of brain AChE activity as a response to the effects caused by exposure to dextran-coated iron oxide nanoparticles in adult zebrafish" has been received by journal Neurotoxicology

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/neutox/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Professor Joan Cranmer
Editor-in-Chief, NeuroToxicology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

ANEXO II



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

Ofício 082/12 – CEUA

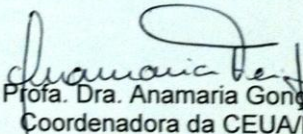
Porto Alegre, 21 de junho de 2012.

Senhor Pesquisador:

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 12/00288, intitulado: **“Modulação da neurotransmissão colinérgica como resposta aos efeitos causados pela exposição à nanopartículas de óxido de ferro utilizando Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo de estudo”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,


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

Ilmo. Sr.
Prof. Maurício Reis Bogo
Faculdade de Biociências
Nesta Universidade

PUCRS

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