

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

Maria Cristina Berta Sant`Anna

**Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo para estudo da toxicidade
induzida pelo ferro**

Porto Alegre

2009

Maria Cristina Berta Sant`Anna

Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo para estudo da toxicidade induzida ferro

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

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Reis Bogo

Porto Alegre
2009

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Rodrigo, pela compreensão nas horas de estudo e dedicação. Aos meus filhos Matheus e Pedro, que são a prova do amor verdadeiro, incondicional que uma mãe pode ter e que sempre estiveram ao meu lado, me dando amor, carinho e muitas alegrias. São a razão pela força e vontade de seguir em frente.

Aos meus pais, que sempre acreditaram em mim e apostaram nos meus estudos. Que me ajudaram a me tornar uma pessoa batalhadora e que acredita em seus sonhos, possibilitando realizá-los. Por toda uma vida de companheirismo e muito amor.

Ao meu irmão, Paulo Affonso, minha cunhada Greice, meus afilhados Victor e Arthur, que são companheiros e amigos para todas as horas. Pessoas com que sempre pude contar e que juntos formamos uma grande família. Ao Paulo e Fernando Cruz, que estiveram sempre ao meu lado, me apoiando em minhas decisões. À minha Tia Eleonora Sant'Anna, pelo apoio incondicional, sempre escutando minhas indagações e me encorajando a seguir em frente, com muito carinho e amor.

Ao professor Dr. Mauricio Reis Bogo que sabendo se tratar de uma historiadora, com muita vontade estudar Biologia Molecular, acreditou que eu conseguiria e me ajudou, me apoiando nos momentos mais difíceis, e tornando este sonho em realidade. Muito obrigada Mauricio!

Ao professor Jarbas de Oliveira pelo seu interesse, amizade e grande dedicação em me ensinar os experimentos e estar ao meu lado na bancada.

À professora Dra. Themis Reverbel pela sua imensa ajuda, auxiliando e guiando o nosso estudo com grande competência e acreditando no projeto.

À professora Dra. Carla Bonan que com sua paciência infinita esteve sempre disposta a nos ajudar, a nos escutar, e acompanhou esta trajetória de perto.

À professora Dra. Clarisse Alho, que possibilitou minha entrada na Biologia e foi sempre uma grande amiga, acompanhando de perto minhas conquistas. Muito obrigada!

À professora Dra Yur Maria Tedesco, que me ajudou a compreender a importância de ser uma pesquisadora e me incluiu em suas jornadas científicas, me convidando para conhecer as pessoas e falando em mim.

À minha amiga Vanessa Soares, companheira para todas as horas, que juntas traçamos esta trajetória que nos possibilitou conhecer e compreender o mundo científico e fortalecer cada vez mais nossa amizade.

As amigas e participantes do meu trabalho Kelly Juliana Seibt e Gabrielle Ghisleni que foram maravilhosas, me acompanharam, lado a lado, tornando possível a realização deste sonho. Sem a ajuda e competência delas com certeza não seria possível esse feito.

À Flavia Helena da Silva, que durante muitas tardes me ensinou Biologia, me ajudando a entrar no Mestrado e conseguir, com muita dedicação, acompanhar as disciplinas. E acima de tudo, uma amiga que acreditou e investiu na minha vontade de vencer.

Aos meus colegas e amigos do laboratório Eduardo Pacheco Rico, Denis Rosenberg, Fernanda Zimmermann, Renata Oliveira, Katiucia Marques Capiotti, Talita Pereira que foram incansáveis em responder meus questionamentos, dúvidas e sempre estiveram disponíveis em ajudar nos experimentos.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, especialmente à Faculdade de Biociências por me acolher ao longo da pós-graduação.

À secretaria do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular; devido a sua competência, me mantendo sempre bem informada a respeito de tudo sobre o programa e oferecendo toda a atenção possível.

SUMÁRIO

Resumo	6
Abstract	7
1. Capítulo 1-Introdução e Objetivos	8
1.1. Introdução	9
1.1.1. Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	9
1.1.2. Ferro	12
1.1.3. Sinalização Colinérgica	18
1.2. Objetivos	20
1.2.1. Objetivo Geral	20
1.2.2. Objetivos Específicos	20
2. Capítulo 2 (manuscrito)	21
3- Considerações Finais	47
Referências Bibliográficas	49
ANEXO 1: COMPROVANTE DE APROVAÇÃO PELO CEUA	57
ANEXO 2: COMPROVANTE DE SUBMISSÃO AO PERIÓDICO	58

RESUMO

O zebrafish é um pequeno teleósteo usado atualmente como organismo modelo em diversas áreas das ciências. As bases moleculares da neurobiologia e o genoma similar aos humanos proporcionam o seu uso em diversos tipos de estudos, que incluem toxicológicos, genéticos e patológicos. Estudos demonstraram que o déficit de ferro pode gerar diversos tipos de anemias enquanto seu acúmulo pode estar relacionado com diversas patologias, como a Hemocromatose Hereditária, no fígado e Doenças Neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, no cérebro. O sistema colinérgico tem sido amplamente utilizado como parâmetro para avaliar a ação de agentes tóxicos e alteração de padrões comportamentais. A enzima Acetilcolinesterase (AChE), uma vez inibida, pode gerar um acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas e junções musculares, resultando em um aumento da transmissão excitatória. O gene da AChE foi clonado e seqüenciado no zebrafish. O uso crescente do zebrafish em diversos estudos envolvendo exposição a agentes tóxicos e fármacos, dá suporte a seu uso como um modelo experimental atrativo para avaliar os efeitos do ferro em diferentes tecidos. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da exposição a diferentes concentrações de ferro sobre a atividade da acetilcolinesterase em cérebro e fígado de zebrafish adultos, assim como investigar a possível correlação destes efeitos com o conteúdo de ferro acumulado em cada um dos tecidos analisados. Nos ensaios *in vitro*, o ferro foi capaz de promover um aumento significativo na atividade da acetilcolinesterase em cérebro (52%) e fígado (53%) quando os tecidos foram expostos a mais alta concentração de ferro testada (2.6 mM). Um aumento desta atividade enzimática foi observado nos ensaios *in vivo*, na presença de 15mg/L de ferro, tanto em cérebro (62%) quanto em fígado (70%). A análise de PCR semi-quantitativo mostrou não haver modulação nos níveis de transcritos do gene que codifica a AchE em ambos os tecidos de zebrafish. Além disto, foi demonstrado que o ferro estava significativamente aumentado no fígado quando os peixes foram expostos a 15mg/L (226%) e 150mg/L (200%), mas não no cérebro. Estes resultados indicam que o ferro pode promover alterações significativas na atividade da AchE, mas que o aumento da atividade não parece estar diretamente relacionado com o aumento de ferro nestes tecidos de zebrafish.

Palavras chaves: Zebrafish, Exposição ao ferro, Acetilcolinesterase, Cérebro, Fígado.

ABSTRACT

Zebrafish is a small teleost currently used as a model organism in several different areas of research. Its molecular neurobiology and genome similarities to humans allow its use in different types of studies including toxicological, genetic and pathological analysis. Studies have shown iron deficiency can cause anemia and its overload can be related to pathologies such as hereditary haemochromatosis in the liver and neurodegenerative diseases in the brain like Alzheimer and Parkinson. The cholinergic system has been widely used as a parameter to evaluate the action of toxic agents and behavior pattern alternation. Once removed, the acetylcholinesterase can cause the accumulation of acetylcholine in the nerves synapses and muscle junctions, resulting in an excitatory transmission increase. The AChE gene was cloned and sequenced in the zebrafish. The increasing use of zebrafish in several studies involving exposure to toxic agents and drugs, supports its use as an attractive experimental model to evaluate the effects of iron in different tissues. Accordingly, the purpose of this study was to evaluate the effects of the exposure to different concentrations of iron on the activity of acetylcholinesterase in brain and liver of adult zebrafish, as well as, to investigate its possible correlation with the content of iron accumulated in each tissue analyzed. In *in vitro* tests, the iron was able to promote a significant increase in the activity of acetylcholinesterase in brain (52%) and liver (53%) when the tissues were exposed to high concentration of iron tested (2.6 mM). An increase of enzyme activity was observed in tests *in vivo* in the presence of 15mg / L of iron, both in brain (62%) and in liver (70%). The analysis of semi-quantitative PCR showed no modulation in the levels of transcripts of the gene encoding acetylcholinesterase in both tissues of zebrafish. Furthermore, it was demonstrated that the iron in the liver was significantly increased when the fish were exposed to 15mg/ L (226%) and 150mg/L (200%) but not in brain. These results indicate that iron can promote significant changes in the activity of acetylcholinesterase, but that increased activity does not appear to be directly related to the increase of iron in tissues of zebrafish.

Key words: Zebrafish, Iron, **acetylcholinesterase**, brain, liver.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Zebrafish (*Danio rerio*)

Há 30 anos o pesquisador George Streisinger escolhia o zebrafish (*Danio rerio*), um teleósteo da família Cyprinidae, como modelo para seu laboratório em estudos genéticos. Hoje este peixe, conhecido como paulistinha no Brasil, é utilizado por diversos pesquisadores em muitos locais. Os motivos são bastante evidentes hoje em dia: é um vertebrado diplóide com um bom equilíbrio entre a complexidade e a simplicidade (Streisinger et al. 1981).



Figura 1. Exemplar adulto de zebrafish

blogs.nature.com/nm/spoonful/zebrafish.jpg

Suas características tornam este peixe um modelo seguro na pesquisa em nossos tempos. Medindo aproximadamente entre três e quatro centímetros, este teleósteo pode ser facilmente mantido e distribuído nos aquários, necessitando de pouco espaço. Além disso, possui baixo custo, de aproximadamente 0,60 centavos a unidade, alta taxa de fecundidade, com um casal podendo colocar 200-300 ovos em uma manhã, e se mantidos em estado favorável, repetir este ciclo a cada 5-7 dias, seus embriões são transparentes e possuem uma rápida maturação sexual, entre três e seis meses (Hill et al., 2005).

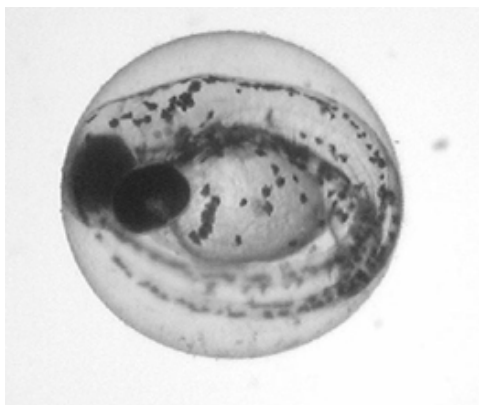


Figura 2: Embrião de zebrafish

Federal Research Centre for Fisheries

O crescimento no número de artigos publicados usando o zebrafish está diretamente ligado ao crescente conhecimento sobre esta espécie. O seqüenciamento do genoma, iniciado pelo Instituto Senger em 2001, possibilitou o uso em diversos estudos genéticos (Stern & Zon 2003). Pesquisas relacionadas com genes humanos são cada vez mais desenvolvidas utilizando este modelo uma vez que o seu genoma apresenta alto grau de similaridade com os genomas de humanos e de camundongos (Barbazuk et al., 2000; Lieschke & Currie, 2000). Hoje o zebrafish possui grande importância na pesquisa mundial, resultando na criação de um site especializado neste assunto, ZFIN (<http://zfin.org>), onde são depositadas todas as informações necessárias para o seu uso.

Este teleósteo possui grande sensibilidade quando exposto a produtos químicos por ser capaz de absorver de forma rápida os compostos que são diretamente adicionados na água e acumulá-los em diferentes tecidos, principalmente no Sistema Nervoso Central, como demonstrado em estudos com o cobre (Grossel & Wood, 2002). Vários testes de toxicidade e efeitos farmacológicos já foram descritos (Goldsmith, 2004; Heideman, 2005; Carney & Peterson, 2006; Hill et al, 2005, Parng, 2002; Parng, 2005; Stern & Zon, 2003),

como por exemplo, quando expostos ao urânio (Labrot et al., 1999), ao Malation e Metronidazol (Lanzky & Halling-Sorensen, 1997), a anilina (Zok et al., 1991) e a colchicina (Hill et al., 2005, Roche et al., 1994).

As bases moleculares da neurobiologia têm sido extensivamente estudadas em zebrafish resultando na caracterização de muitos genes. Entre estes estão os envolvidos na formação de circuitos neuronais, em padrões de comportamento e em mecanismos envolvidos na neuropatogênese (Vascotto et al., 1997; Guo, 2004).

A toxicidade sobre a neurotransmissão purinérgica foi demonstrada para os pesticidas Carbofuran e Malation (Senger et al., 2005), metais neurotóxicos zinco e cádmio (Senger et al, 2006a), metanol (Rico et al., 2006), etanol (Rico et al., 2007), metais pesados como o mercúrio e chumbo (Senger et al, 2006b) e cobre (Rosemberg et al., 2007).

Outros sistemas de neurotransmissão já foram identificados nesta espécie e incluem: glutamatérgico (Edwards and Michel, 2002), colinérgico (Behra et al., 2002; Clemente et al., 2004), dopaminérgico (Boehmler et al., 2004), serotoninérgico (Rink & Guo, 2004), histaminérgico (Kaslin and Panula, 2001), gabaérgico (Kim et al., 2004) e purinérgico (Kucenas et al., 2003; Rico et al., 2006; Senger et al, 2006^a; Rosenberg et al, 2007).

Estudos demonstraram alterações comportamentais em zebrafish quando submetidos ao álcool e a drogas de abuso (Guo, 2004). Quando expostos ao álcool apresentaram alteração na atividade locomotora (Gerlai, 2000), hipoatividade, em doses baixas e hiperatividade em altas doses, e alterações comportamentais como agressividade, comportamento social e comportamento predatório (Guo, 2004, Gerlai et al, 2000). Testes de lugar de preferência (CPP) se mostraram eficientes para avaliar os efeitos da exposição a drogas de abuso nesta espécie, como por exemplo, cocaína (Derland e Dowling, 2001),

morfina (Bretaud et al, 2007; Guo, 2008), tornando-o um bom modelo animal para estudos comportamentais.

Estudos demonstraram que o ferro presente na água pode ser absorvido pelo peixe via brânquias, pele ou alimentação (Roeder and Roeder, 1966; Andersen, 1997). Além disso, esse teleósteo oferece um excelente sistema para a análise de genes envolvidos no metabolismo do ferro (Fraenkel, 2005). Seus principais componentes com homologia em humanos já foram descritos, como o Transportador Divalente de Metal 1, (DMT1), (Donovan, et al. 2002), o Receptor de Transferrina (TfR), (Wingert, et al. 2004), Ferroportina (Fpn1), (Donovan et al, 2000), também conhecida como IREG1 (McKie et al, 2000) e MTP1 (Abboud & Haile, 2000). Estas características tornam a análise da metabolização do ferro possível neste modelo animal.

1.1.2 – O Ferro

O ferro é um dos metais mais abundantes na terra e essencial para todos os organismos (Bury, 2003). Este metal é vital para a sobrevivência, pois é essencial para os múltiplos processos metabólicos como transporte de oxigênio, síntese de DNA, transporte de elétrons (Crichton, 2001) e co-fator para muitas proteínas (Zecca et al, 2004). Sua importância é demonstrada em estudos das mais variadas áreas.

A metabolização do ferro consiste em sua absorção, transporte e armazenamento. A sua absorção depende de diversos fatores, como a quantidade de ferro circulante, o ferro ingerido na dieta, entre outros. Uma vez no organismo o ferro é absorvido pelo duodeno e sua regulação se dá através do DMT-1. Esta proteína de membrana, também denominada transportadora de cátion divalente 1 (DCT-1, *divalent cation transporter 1*) ou (nramp-2, *natural resistance-associated macrophage protein 2*) também é responsável pelo

transporte de outros metais, como magnésio, cobre, zinco, cobalto, cádmio, chumbo e níquel (Frazer et al., 2003; Frazer & Anderson, 2003; Bothwell, 1995; Rolfs & Heidiger, 1999; Latunde-Dada et al, 2002).

Esta regulação é influenciada pelos estoques de ferro do organismo (Frazer et al., 2003; Frazer & Anderson, 2003) onde há um aumento em situações de deficiência e uma diminuição em casos de sobrecarga, confirmando assim a importância destes estoques (Braga et al., 2006). Após sua absorção o ferro pode então ser armazenado ou exportado pela membrana basolateral dos enterócitos via Fpn1 para a circulação (Donovan et al, 2000; Fraenkel et al, 2005; Fernandez et AL, 2007). Esta proteína é também conhecida como Ireg1(iron regulated gen 1) ou MTP-1(metal transporter protein 1). Sua expressão é aumentada com a deficiência de ferro no organismo (McKie et al, 2000, Frazer et al., 2003, Frazer & Anderson, 2003), ou seja, a sua regulação está diretamente ligada a quantidade do metal (Braga, 2006). Os enterócitos presentes no intestino possuem receptor de TfR associados à proteína da hemocromatose hereditária (HfE). Esta interação atenua a entrega de ferro para o interior celular (Fernandez et al, 2007).

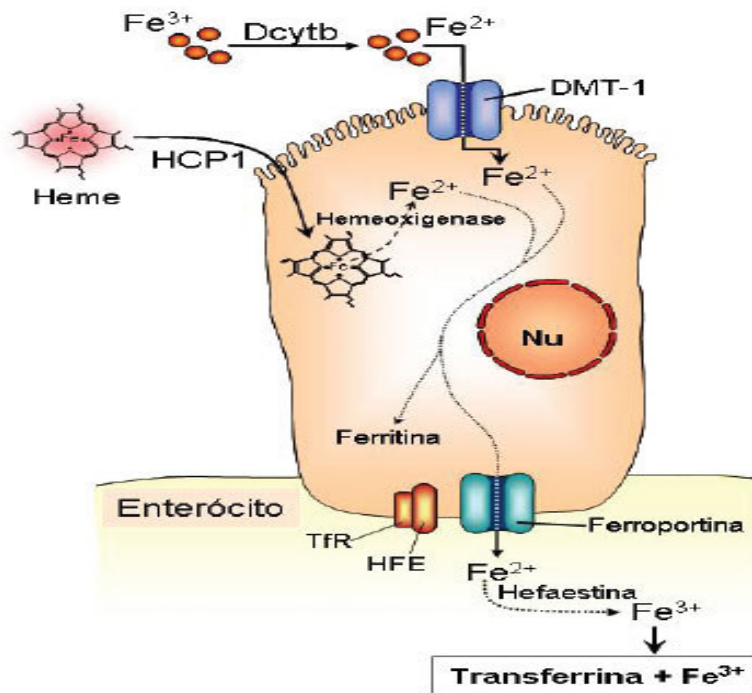


Figura 1. O enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do ferro. Dcytb: ferredutase; DMT-1: transportador de metal divalente-1; HCP-1: proteína transportadora do heme-1; Nu: núcleo; HFE: proteína da hemocromatose; Tfr: receptor da transferrina

Figura 3. Metabolismo do ferro (Grotto, 2008).

Uma vez no sistema circulatório o ferro se liga a uma apotransferrina, formando a Tf (Braga et al, 2006). Essa proteína é capaz de ligar firmemente dois átomos de ferro por molécula em dois sítios de ligação impedindo a presença de ferro livre na circulação (Bridges, 1992). Dentre o ferro transportado pela Tf, de 70 a 80% são levados à medula óssea para formar novas hemácias, e os demais são destinados para a síntese de mioglobina, citocromos, enzimas e proteínas que necessitam do ferro como co-fator, além do transporte para os estoques hepáticos (Barrios et al, 2000). No plasma o ferro é abundante nos eritrócitos, complexado a hemoglobina, responsável pela circulação de oxigênio no corpo. Quando senescentes (aproximadamente 120 dias de vida média) estes glóbulos vermelhos são degradados pelos macrófagos, principalmente no fígado e no baço, resultando na renovação das hemácias. Estes macrófagos também podem receber ferro proveniente da eritropoiese ineficaz (Hagar et al, 2002; Barrios et al, 2000). Após os

macrófagos realizarem a eritrofagocitose, ocorre a degradação enzimática onde a hemoglobina sofre digestão proteolítica liberando o grupo heme. O ferro é então transportado para fora do macrófago por uma proteína transmembrana, que tudo indica ser a fpt1. O ferro livre novamente é oxidado (transformado em Fe^{3+}) pela ceruloplasmina e se liga então a Tf circulante que o distribui aos tecidos com TfR (Fernandez et al, 2007; Braga et al, 2006; Poss & Tonegawa, 1997). Nas células, proteínas como a Ferritina e a Hemossiderina são responsáveis pelo estoque de ferro quando este excede as necessidades metabólicas (Braga et al., 2006). Sendo assim, exerce também um papel protetor contra os efeitos do ferro livre (Remacha & Arrizabalaga, 2002). Todas as células podem expressar ferritina, mas esta proteína é produzida principalmente nos hepatócitos, medula óssea, fígado e baço (Beard et al., 1996; Remacha & Arrizabalaga, 2002). A quantidade de ferro armazenado é variável chegando à extinção em casos de anemia e pode aumentar mais de 20 vezes em caso de sobrecarga (Dallman, 1992; Dallman et al., 1992; Hallberg, 1981; Dallman et al., 1980). Em casos de acúmulo excessivo a hemossiderina é a responsável pelo armazenamento uma vez que esta proteína, encontrada nos macrófagos da medula óssea, do fígado e do baço, contém cerca de 30% mais ferro que a ferritina (Braga et al, 2006).

A homeostase do ferro é muito importante e é mantida através do correto funcionamento de seu metabolismo. O principal processo responsável pela homeostase de ferro no organismo é a absorção intestinal (Braga et al., 2006) e a hepcidina está diretamente ligada a este processo. Produzida no fígado, circula no plasma e é excretada na urina (Fraenkel et al, 2005). Esta proteína parece atuar como sinalizador, limitando a absorção intestinal do ferro e regulando a expressão da Fpn1, em resposta ao estado de ferro do organismo e às necessidades para eritropoiese (Frazer & Anderson, 2003, Leong & Lönnerdal, 2004).

A deficiência de ferro, devido principalmente a perda progressiva dos estoques de ferritina e hemossiderina, se dá pela perda crônica de sangue. A eritropoiese estimulada, reduzida ingestão dietética de ferro, inibição da absorção intestinal e inibição da liberação do ferro também contribuem para a deficiência (Hörl, 2008). Esta deficiência resulta em diversos tipos de anemia (Motta, 2005).

Em contrapartida, a sobrecarga de ferro predispõe a uma deposição nociva. Em sua forma aguda pode haver acidose, insuficiência hepática e choque (Braga et al, 2006). Doenças como a Hemocromatose Hereditária, caracterizada por distúrbio do metabolismo do ferro (Couto, 2007), onde há uma mutação nas proteínas HfE (Hemocromatose clássica tipo I), Fpn1 (Hemocromatose tipo IV, também conhecida como doença da ferroportina), entre outras, gera acúmulo de ferro no fígado e outros tecidos como coração, glândula pituitária e cérebro (Fernandez et al, 2007). Estudos demonstraram que a absorção de ferro a partir do intestino delgado desses pacientes é altamente elevada (Powell et al, 1970). Alteração na atividade da Fpn1 pode levar ao acúmulo de ferro nos macrófagos do fígado e do baço (Donovan, 2002, Couto, 2007). Estudos associando pacientes com deficiência na Fpn1 e utilizando a base molecular do zebrafish demonstraram que o ferro pode acumular nestes tecidos sugerindo conseqüente perda de função (Girelli et al, 2008).

A Hemocromatose secundária é causada por transfusões crônicas de concentrado de eritrócitos por doenças hematológicas, tais como talassemia maior, anemia falciforme, outras hemoglobinopatias e anemia aplásica (Harmatz et al, 2000; Hofmann et al, 1996).

O aumento da expressão da ferritina caracteriza um aumento de depósito de ferro, e é encontrado em indivíduos idosos, com envelhecimento normal, mas com mais intensidade em pacientes que apresentam doenças neurodegenerativas (Zecca et al., 2004).

A geração de radicais livres faz parte de um sistema de proteção eficiente do corpo sendo usado como defesa contra microorganismos invasores, células tumorais e outras

células que devem ser removidas. Mas ao mesmo tempo podem ser tóxicos, danificando lipídios, proteínas, DNA e RNA celulares, levando a lesão celular. Contra estes as células possuem sistemas de defesa, que são proteínas quelantes de metais, enzimas de defesa e antioxidantes. O estresse oxidativo é gerado pelo desequilíbrio entre a taxa de geração e a capacidade de remoção de radicais livres, podendo estar presente ou gerar diretamente uma patologia (Fernandez et al, 2007).

O cérebro está suscetível a estes radicais uma vez que possui alto consumo de oxigênio, altos níveis de ferro, pouca concentração de agentes protetores (Ward et al, 1994, Fernandez, 2007). Estudos mostram que acúmulo do metal em regiões específicas do cérebro, mau funcionamento do metabolismo ou homeostase do ferro podem estar relacionadas com doenças neurodegenerativas. Esta desordem gera a formação de corpos de inclusão intracelular de proteínas e ferro que podem ser vistos em pacientes *post-mortem* com algumas doenças, como Alzheimer e Parkinson (Zecca et al., 2004), levando à perda neuronal (Fernandez, 2007). Um estudo em humanos sugere que o mau funcionamento no metabolismo do ferro, gerando estresse oxidativo e formação de radicais livres, seja um dos fatores patogênicos no parkinsonismo. Mas não é sabido se este acúmulo é a causa ou a consequência desta doença. (Jellinger, 1999). Já foram relatadas mutações em genes reguladores da homeostase do ferro sugerindo seu papel fundamental na ocorrência de morte neuronal (Ke e Qian, 2003; Polla et al., 2003). Outros estudos mostram que regiões associadas à função motora tendem a ter mais ferro do que regiões não motoras, confirmando a concentração seletiva (Koeppen, 1995).

A consequência deste acúmulo pode ser a perda de neurônios ou o mau funcionamento dos mesmos (Zecca et al., 2004). Entre estes neurônios afetados estão os colinérgicos (Youdim et al., 2005), e desta forma, a atividade da AChE pode ser analisada como um marcador de toxicidade causada pelo depósito de ferro.

1.1.3 - O Sistema Colinérgico

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor excitatório que atua nas junções neuromusculares, na memória e em áreas do cérebro relacionadas com o aprendizado (Baynes & Dominiczak, 2007). Está diretamente envolvida com atenção, memória, aprendizagem, dor, locomoção e controle de funções autonômicas (Herlenius & Lagercrantz, 2004). É sintetizada nos neurônios colinérgicos e logo liberada para a fenda sináptica para transmitir o sinal. Logo após a transmissão, a ACh é degradada pelas enzimas responsáveis, as colinesterases (Howland & Mary, 2007).

A acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BtChE), degradam da acetilcolina gerando colina e ácido acético. A degradação pela AChE é feita nas fendas sinápticas, nas hemácias e nos músculos estriados enquanto a BtChE está presente no plasma, no fígado, no pâncreas e no intestino (Senger et al., 2006a). Interessantemente, o zebrafish apresenta uma situação única entre os vertebrados uma vez que apenas o gene que codifica para a AChE está presente em seu genoma (Bertrand et al., 2001). Sendo assim, qualquer influência no sistema colinérgico deste organismo pode ser avaliado pela atividade da AChE, tornando-o um modelo ímpar.

Os receptores da acetilcolina podem ser classificados farmacologicamente como muscarínicos ou nicotínicos, devido aos efeitos sofridos por estes sob a ação da muscarina e da nicotina, respectivamente. Os muscarínicos são receptores metabotrópicos e estão presente em maior quantidade na região do cérebro enquanto os nicóticos são ionotrópicos e se encontram na junção neuromuscular (Baynes & Dominiczak, 2007). Os receptores de acetilcolina estão presentes em todo o sistema nervoso.

O sistema colinérgico tem sido amplamente utilizado como parâmetro para avaliar a ação de agentes tóxicos e alteração de padrões comportamentais. Uma vez inibida a AChE,

a acetilcolina não é degradada, causando um acúmulo deste neurotransmissor nas sinapses nervosas e junções musculares, gerando um aumento excitatório. Este pode levar a alterações comportamentais, como hiperatividade, asfixia e até a morte (Silva et al, 2008).

Estudos sobre a ação de inseticidas organofosforados demonstraram a inibição da acetilcolinesterase causando um efeito tóxico (Roex, 2003; Baynes & Dominiczak, 2007). No fígado de ratos este composto causou inibição da AChE (Goel et al, 2000), sugerindo que sua avaliação hepática pode ser uma ferramenta toxicológica. A AChE como biomarcador de toxicidade em zebrafish já foi demonstrado por alguns estudos envolvendo o cádmio e zinco (Senger et al., 2006a), o etanol (Gerlai et al., 2006; Rico et al., 2007) e o metanol (Rico et al., 2006).

A AChE também pode ser utilizada como marcador de toxicidade ambiental. Substâncias presentes na natureza podem ter ação neurotóxica em organismos aquáticos, como demonstrados em diversos estudos sobre metais (chumbo, cádmio, cobre, manganês e ferro), petróleo hidrocarbonetos nos tecidos dos moluscos marinhos na Índia (Gaitonde et al, 2006). Vários estudos têm demonstrado que altos níveis de inibição da AChE são necessários para provocar uma mortalidade significativa nas espécies aquáticas (Van der Wel e Welling, 1989; Legierse, 1998). No entanto, outros estudos têm mostrado um aumento da atividade após a exposição a concentrações de OPS (Henry e Atchinson, 1984; Kumar e Chapman, 1998). Barillet et al (2007) submeteu Zebrafish a diversas concentrações de Urânio e constatou um aumento significativo da AChE no cérebro.

A perda de marcadores colinérgicos durante a doença de Alzheimer e durante o envelhecimento levou à hipótese colinérgica para o déficit de memória (Bottino et al., 2006). Neste sentido, foi mostrado que no início da doença há perda significativa de neurônios colinérgicos em regiões seletivas do cérebro (Winkler et al., 1998).

1.2- OBJETIVOS

1.2.1- OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da exposição a diferentes concentrações de ferro em zebrafish adultos.

1.2.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar os efeitos da exposição a diferentes concentrações de ferro sobre a atividade da acetilcolinesterase em fígado e cérebro de zebrafish.
2. Verificar o acúmulo de ferro em diferentes tecidos (cérebro, fígado, baço, brânquias e coração) de zebrafish adultos expostos a diferentes concentrações de ferro.

CAPÍTULO 2 – ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo científico submetido à revista Comparative Biochemistry and Physiology Part C.

Iron-induced modulation of acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain and liver

Maria Cristina Berta Sant`Anna^a, Vanessa de Matas Soares^a, Kelly Juliana Seibt^b, Gabriele Ghisleni^b, Eduardo Pacheco Rico^c, Jarbas Rodrigues de Oliveira^d, Nadja Schröder^e, Carla Denise Bonan^{b*}, Mauricio Reis Bogo^{a*}.

**Iron-induced modulation of acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*)
brain and liver**

Maria Cristina Berta Sant'Anna^a, Vanessa de Matas Soares^a, Kelly Juliana Seibt^b, Gabriele Ghisleni^b, Eduardo Pacheco Rico^c, Jarbas Rodrigues de Oliveira^d, Nadja Schröder^e, Carla Denise Bonan^{b*}, Mauricio Reis Bogo^{a*}.

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

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

^c Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^d Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

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

***Corresponding authors**

cbonan@pucrs.br (C.D. Bonan) and mbogo@pucrs.br (M.R. Bogo)

Tel.: +55 51 3320 3500 Ext.: 4726

Fax: +55 51 3320 3568

Abstract

Iron is one the most abundant metals on the earth being essential for living organisms, although it is well documented that its free form can be toxic. In humans, the excess of this metal may be related with some brain and liver disorders, such as Alzheimer's and Parkinson's diseases, and hemochromatosis. The aim of the present study was to evaluate de effects of iron exposure on acetylcholinesterase activity in zebrafish brain and liver, as well as investigate the possible correlation with the iron content in the tissue. Thus, different corresponding concentrations of iron were tested *in vitro* (0.018, 0.268, and 2.6 mM) and *in vivo* (1, 15 and 150 mg/L) assays. For *in vitro* assays, iron was able to promote a significant increase on brain (52%) and liver (53%) acetylcholinesterase activity when tissue was exposed to the highest iron concentration (2.6 mM). A significant increase in this enzyme activity was observed in *in vivo* assays in the presence of 15 mg/L in both brain (62%) and liver tissues (70%). Semi-quantitative RT-PCR has not shown significant alterations on the expression levels of acetylcholinesterase mRNA in zebrafish brain and liver. Moreover, we observed that iron content was significantly increased only in liver tissue when exposed to 15 (226%) and 150 mg/L (200%). These results indicate that iron can promote significant alterations on acetylcholinesterase activity but that the high activity seems not be related with iron content in zebrafish tissues.

Key words: Iron, toxicity, acethylcholinesterase, zebrafish

1. Introduction

Iron is one of the most abundant metals on the earth (Bury, 2003). This metal is vital for all living organisms being essential for multiple metabolic processes, including oxygen transport, electron transport on the respiratory chain (Crichton, 1991), DNA synthesis and as cofactor for many proteins involved in the normal cells function (Zecca et al, 2004). Although iron is essential for the cell functioning, its free form can be toxic (Donovan et al, 2002). This toxicity is largely based on Fenton chemistry where iron reacts with reactive oxygen intermediates, including hydrogen peroxide (H_2O_2) and the superoxide anion (O_2^-), both byproducts of aerobic metabolism, to produce highly reactive free radical species, such as the hydroxyl radical ($OH\cdot$).

Brain cells have relatively low antioxidant defenses (Ward et al, 1994) and are especially susceptible to metal toxicity (Crichton et al, 2002). Studies have demonstrated that iron is present in some protein aggregates observed in Alzheimer's and Parkinson's patients brains in *post-mortem* studies (Zecca et al, 2004). A number of studies have reported an accumulation of iron specifically in the striatum of *post-mortem* brain samples of patients suffering from Huntington's disease (Dexter et al, 1991; Dexter et al, 1992; Chen et al, 1993; Lumsden et al, 2007). Additionally, the iron systemic overload disorder, hemochromatosis, is one of the most common genetic disorders in individuals and is associated in humans with mutations in various genes, responsible for different forms of hemochromatosis (Donavan et al, 2002; Feder et al, 1996; Njajou et al, 2001).

The establishment of the relationship between behavioral changes and iron accumulation in regions of the brain has been a challenge for many researchers (Fredriksson et al., 1999, Fredriksson et al., 2001; Guo, 2004, Lima et al., 2005a, b, Lima et al., 2008). Studies demonstrated that rats subjected to iron treatment in the neonatal period presented recognition memory deficits in adulthood, and that this cognitive

impairment was prevented with the administration of an iron chelator (Lima et al., 2007). Moreover, studies have shown that changes on locomotor activity promoted by iron could be related with the increase of iron content in specific brain areas (Fredriksson & Archer, 2003).

Acetylcholine (ACh) is a classical neurotransmitter involved in learning and memory process, control of motor tonus, and autonomic functions (Herlenius & Lagercrantz, 2004). After released, ACh is rapidly removed from the synaptic cleft by acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7), which belongs to the family of type B carboxylesterases and cleaves ACh into choline and acetate. The measurement of AChE activity in organisms is widely used as a specific biomarker of toxicity (Roex, 2003). Several studies demonstrated the inhibitory effect of toxic agents on AChE activity in zebrafish brain as demonstrated to cadmium and zinc (Senger et al, 2006), ethanol (Gerlai et al, 2006; Rico et al, 2006a) and methanol (Rico et al, 2006b).

Zebrafish (*Danio rerio*) is a small freshwater teleost widely used as a vertebrate model of developmental, neurobiological, toxicological and pharmacological studies (Rubinstein, 2003; Guo, 2004; Goldsmith, 2004; Hill et al., 2005). Zebrafish presents a unique situation among vertebrates, because AChE is the only ACh-hydrolyzing enzyme in this organism (Behra et al., 2002). Recently, cholinergic system has been shown to be widely distributed in the zebrafish brain, according to the results of an immunocytochemical study on choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholinesterase (AChE) (Park et al., 2008).

Considering the role of iron accumulation in human diseases described above and the important function that cholinergic system plays in the central and peripheral nervous systems, the aim of this work was evaluate the effect of *in vitro* and *in vivo* exposure to iron on AChE activity in preparations of brain and liver tissue. Moreover, we evaluated the

consequence of the *in vivo* treatment on the content of this metal in the water and in both tissues.

2. Material and Methods

2.1 Animals

Adult wild-type zebrafish (*Danio rerio*) of both sexes were obtained from commercial supplier (Delphis, RS, Brazil) and acclimated for at least 2 weeks in a 50-L thermo stated aquarium. The fish were kept on a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 am) at a temperature of $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ and the animals were fed with commercial fish pellet twice a day. The use and maintenance of zebrafish were according to the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals, being healthy and free of any signs of disease. The Ethics Committee of Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) approved the protocol under the number 08/00025– CEUA.

2.2 Chemicals

Trizma Base, ethylenedioxy–diethylene–dinitrilo–tetraacetic acid (EDTA), ethylene glycol bis(beta amino ethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), sodium citrate, Coomassie Blue G, bovine serum albumin, acetylthiocholine, 5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) was purchased from Sigma (St. Louis, USA). Ferrous sulphate was from analytical grade.

2.3 In vitro and in vivo treatments

The iron doses and time of treatment for *in vitro* and *in vivo* assays were chosen based on acceptable iron concentrations present in drinking water (0,3 mg/L) and water effluents as previously described (Lima et al., 2001; Iron Criteria, 2005, CONAMA, 1986).

For *in vitro* assays, the brain and liver samples were directly added to the reaction medium containing iron at final concentrations in the range of 0.018, 0.268, and 2.6 mM, pre-incubated for 10 min with the homogenate and maintained throughout the enzyme assay. For the control group, the enzyme assay was performed in the absence of iron. For *in vivo* treatments, corresponding doses of iron used in *in vitro* assays, 1, 15, and 150 mg/L, were administered by placing the fishes in tanks containing 2L water for 24h. After the time of treatment, brain and liver from zebrafish were removed for determination of AChE activity.

2.4 Determination of AChE activity

Brain and liver from zebrafish were homogenized on ice in 60 volumes (v/w) of Tris-citrate buffer (50mM Tris, 2mM EDTA, 2mM EGTA, pH 7.4, with citric acid) in a motor driven Teflon-glass homogenizer. The rate of acetylthiocholine hydrolysis (0.8 mM) was determined in a final volume of 2 ml assays solutions with 100 mM phosphate buffer, pH 7.5, and 1.0 mM DTNB using a method previously described (Ellman et al., 1961). Brain samples containing 10 µg of protein and liver samples containing 5 µg of protein were added at the reaction medium described previously and pre-incubated at 25°C for 10 min. The reaction assay began with the substrate addition and the rate of acetylthiocholine hydrolysis was monitored by the formation of thiolate dianion of DTNB at 412nm for 2–3 min (30s intervals). Controls without the homogenate preparation were performed in order to determine the non-enzymatic hydrolysis of acetylthiocholine. The linearity of absorbance related to time and protein concentration was previously determined. AChE activity was expressed as micromole of thiocholine (SCh) released per hour per milligram of protein. Four different experiments were performed and the assays were run in triplicate.

2.5 Iron Measure

Iron was quantified in the water of the tanks and in brain and liver of zebrafish after 24 hours of exposure to iron at different concentrations (1, 15 and 150 mg/L). Zebrafish brain and liver were removed and homogenized in 0.5 mL deionized water and centrifuged at 10000xg. The iron was measured on the supernatant by commercial kit Labtest (Minas Gerais, Brasil). The water samples were sent to the LAPA (Laboratório de Processos Ambientais – PUCRS; Porto Alegre; Brazil) to determine the iron concentration.

2.6 Molecular analysis

Forward (5'-CCAAAAGAATAGAGATGCCATGGACG-3') and reverse (5'-TGTGATGTTAAGCAGACGAGGCAGG-3') AChE primers and the optimal conditions for RT-PCR were used according to Rico et al. (2006). The β -actin primers forward (5'-GTCCCTGTACGCCTCTGGTCG-3') and reverse (5'-GCCGGACTCATCGTACTCCTG-3') were used as described previously (Chen et al., 2004).

Total RNA was isolated from zebrafish brain using TRIzol reagent (Invitrogen) in accordance with manufacturer instructions. RNA was quantified by spectrophotometer and all samples were adjusted to 160 ng/ μ L. cDNA species were synthesized using SuperScript IIITM First-Strand (Synthesis System for RT-PCR) Invitrogen Kit following the suppliers. One microliter of RT reaction mix was used as a template for each PCR. PCR for AChE was performed in a total volume of 25 μ L using 0.08 μ M of each primer, 0.2 μ M dNTP, 2 mM MgCl₂ and 1U Taq DNA polymerase (Invitrogen). PCR for β -actin gene was performed in a total volume of 20 μ L using 0.1 μ M of each primer, 0.2 μ M dNTP, 2 mM MgCl₂ and 0.5U Taq DNA polymerase (Invitrogen). PCR were conducted at 1 min at 94°C, 1 min at 60°C (AChE) and at 54°C (β -actin), and 1 min at 72°C for 35 cycles. A post-

extension cycle at 72°C was performed for 10 min. For each set of PCR, a negative control was included. PCR products were analyzed on 1% agarose gel, containing GelRed® and visualized with ultraviolet light. The low DNA Mass Ladder (Invitrogen) as used as molecular marker and normalization was performed employing β -actin as a constitutive gene. The band intensities were measured by optical densitometry analysis and the enzyme/ β -actin mRNA ratios were established for each treatment using the Kodak 1D Image Analysis Software.

2.7 Protein determination

Protein was measured using Coomassie Blue as color reagent and bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976).

2.8 Statistical analysis

Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-hoc test, and expressed as means \pm S.D. Differences were considered significance for $p < 0.05$.

3. Results

The effect of different iron concentrations on AChE activity was demonstrated by *in vitro* (0.018, 0.268, and 2.6 mM) and *in vivo* (1, 15, and 150 mg/L) studies in zebrafish brain and liver. In the *in vitro* experiments, iron treatment only at the highest concentration (2.6 mM) is able to promote a significant increase on brain (52%) (Fig. 1-A) and liver (53%) AChE activity (Fig. 1-B). For the *in vivo* analysis, we verified that 24 hours of iron

treatment at the dose of 15 mg/L increased the AChE activity in both brain (62%) (Fig. 2-A) and liver (70%) (Fig. 2-B).

In order to verify if the increase of acetylthiocholine hydrolysis could be a consequence of transcriptional control, semi-quantitative RT-PCR experiments were conducted when kinetic alterations have been observed on zebrafish brain and liver. Although iron treatment alters the AChE activity, our results have shown no alteration of AChE transcript levels for all doses tested (Fig. 3-A and 3-B).

Sequentially, we evaluated a possible correlation of the iron amount and AChE actions, quantifying the iron in zebrafish brain and liver tissue after 24 hours of *in vivo* treatment at the same doses used to test the AChE activity. The results showed no significant effect of iron treatment in this metal concentration in brain homogenates (Fig. 4-A). However, there was a significant increase on liver iron concentrations of fish submitted to 15 (1.96 ± 0.9) and 150 mg/L (1.8 ± 0.9) when compared with the control group (0.6 ± 0.13) (Fig. 4-B). The content of iron on water was evaluated during and after the 24 hours of iron treatments. The results show that the content of iron in all concentrations tested keep almost constant.

4. Discussion

In the present study, we evaluated the *in vitro* and *in vivo* effect of iron treatment at several concentrations on zebrafish brain and liver AChE activity as well iron content in these tissues. Our results demonstrated that AChE activity was significantly modulated by the highest concentration of iron in *in vitro* assays in both organs evaluated. Despite we showed an increased activity on this enzyme by iron treatment, recent studies have shown that other metals, as zinc and cadmium, did not significantly alter the *in vitro* zebrafish

brain AChE activity (Senger et al., 2006). In this context, Bolognesi et al (2007) showed for *in vitro* assays that the chelation of metals, such as iron and copper, inhibits the activity of AChE in humans. Taking into account this data, we could suggest that effectual role of iron can be preceding directly on the enzyme without the influence of others biological systems, such as cell signaling pathways. Since AChE is anchored to the outer surface of the plasma membrane by a covalently attached glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) structure, previous studies have suggested that modifications on lipid membrane could be responsible by a change in the conformational state of the AChE molecule, which could induce the activation of AChE activity observed after long-term exposure to metals (Kaizer et al., 2005). In addition, although no study has described metal effects on liver AChE activity, in this work we demonstrated that *in vitro* iron treatment was efficient to change liver enzyme activity.

The *in vivo* results established that 15 mg/L of iron was able to promote a significant increase on AChE activity from zebrafish brain and liver. Interestingly, 150mg/L of iron did not promote any modulation on AChE activity in both organs studied. It is possible to speculate that exposure to higher iron concentrations (150mg/L) could trigger the mechanisms involved in the iron metabolism that confer protection against iron-induced damage. In this sense, it was already demonstrated that exposure of *Aedes aegypti* cells to iron at low concentrations increases cytoplasmic iron, whereas higher iron levels results in a decline in cytoplasmic iron levels indicating that excess iron is removed from mosquito cells (Geiser et al., 2006).

There are several mechanisms that could regulate AChE after *in vivo* experiments, which include modifications at transcriptional and/or post-translational levels. Our findings showed that the increased activity observed after iron exposure is not consequence of increased AChE transcript levels. In this sense, it was already demonstrated that AChE

from other sources were clearly regulated by a post-translational event (Robitzki et al., 1997; Keller et al., 2001).

In agreement with our data, Kaiser et al (2005) also observed an increase of brain AChE activity in mice submitted to aluminum treatment. Moreover, several studies have shown the influence of iron in some brain pathologies, like Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's disease (Zecca et al, 2004, Chen et al, 1993; Dexter et al, 1991; Dexter et al, 1992; Lumsden et al, 2007). In this context, metal chelation has been suggested for the development of novel Alzheimer's disease therapies (Cuajunqco et al, 2000; Storr et al., 2007). In another study, Oakley et al (2007) showed that some primary changes in neuronal iron could lead to neurodegeneration in Parkinson's disease, indicating the role played by iron in this disease.

Behavioral alterations such as those observed on cognitive functioning and locomotor activity are observed in neurodegenerative disorders in humans. Studies performed in animals have demonstrated that adult rats exposed to postnatal iron administration presented memory deficits related to iron loading in some brain areas (Schröder et al., 2001). Besides, postnatal treatment with iron potentiates the effects of 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on locomotor activity (Fredriksson et al., 2001; Fredriksson & Archer, 2003), suggesting that iron might be implicated in the functional and neurochemical deficits observed in the neurodegenerative process in Parkinson's disease.

Considering that toxicological effects of iron could be related to its accumulation in several tissues (Schröder et al., 2001; Fredriksson & Aschner, 2003), we evaluated the possible correlation of iron content and AChE activity in zebrafish brain and liver. In the present work, we demonstrated that differently of the liver, there was no significant iron accumulation in brain tissue. Accordingly, the liver is the main site of iron deposition and

storage, and under conditions of iron overload, the liver clears the plasma of excess iron and stores it in ferritin and hemosiderin (Chua et al., 2007). A previous study in fish demonstrated that liver iron stores were increased among fish treated with iron, suggesting that this metal could be accumulated in this zebrafish organ (Fraenkel et al., 2005). Our results indicated that iron accumulated in the brain to a much lesser extension than in the liver, not reaching the levels of statistically significant difference from the control group, in spite of the fact that the effects of iron treatment on AChE activity in the brain were similar to the effects found in the liver in the *in vivo* assays. A likely explanation for these findings might be based on the differential sensitivity of brain versus hepatic enzyme to iron.

Degenerative and progressive neurological disorders like Alzheimer's and Parkinson's disease have been characterized by deficit in the cholinergic neurotransmission (Orhan et al, 2009). In this context, AChE inhibitors has been used in the treatment of both pathologies improving the cognitive and dementia-associated symptoms such as aggressiveness and the ability to perform activities of daily life (Anghelescu & Heuser, 2007; Hasselbalch & Kampmann, 2009). Furthermore, Nelson et al (2009) showed that the treatment with AChE inhibitors was associated with a slower rate of cognitive decline in Alzheimer's disease (AD) and dementia with Lewy bodies (DLB). Recently, more data in the literature have confirmed that memory impairment in mice could be attributed to cholinergic synapse dysfunction (Watanabe et al., 2009). Based in the fact that the cholinergic system can be involved in the development of neurodegenerative pathologies and that metal chelation could be a effective treatment for the progression of these disorders, we can suggest that iron-induced enhancement on AChE activity presented in our work could be contributing to the neurochemical alterations presented in this pathologies.

In summary, our results have shown that iron treatment cause alterations on brain and liver AChE activity when evaluated *in vitro* and *in vivo* assays. The measurement of AChE activity is used worldwide as a biomarker of environmental contamination as demonstrated previously by significant variation of AChE activities attributed to neurotoxic substances like a high concentration of different metals (lead, cadmium, copper, manganese and iron). Here, we observed that iron content seems not to be correlated with changes in AChE activity whereas accumulation of iron in liver zebrafish seems to be attributed to distinct susceptibility between brain and liver to the iron exposure.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and by the FINEP research grant “Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)” 01.06.0842-00. E.P.R. was recipient of fellowship from CNPq. R.L.O. was recipient of fellowship from PIBIC/CNPq/PUCRS. G.G was recipient of fellowship from FAPERGS. The authors thank to LAPA (Laboratório de Processos Ambientais – PUCRS - Porto Alegre/Brazil) for technical support.

References

Anghelescu, I. & Heuser, I., 2007. Acetylcholinesterase inhibitors for dementia-an update. *MMW Fortschr Med.* 149, 76-78.

Behra, M., Cousin, X., Bertrand, C., Vonesch, J.L., Biellmann, D., Chatonnet, A., Strahle, U., 2002. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nat Neurosci.* 5, 111-118.

Bolognesi, M.L., Cavalli, A., Valgimigli, L., Bartolini, M., Rosini, M., Andrisano, V., Recanatini, M., Melchiorre, C., 2007. Multi-target-directed drug design strategy: from a dual binding site acetylcholinesterase inhibitor to a trifunctional compound against Alzheimer's disease. *J Med Chem.* 50, 6446-6449.

Braford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 218-254.

Bury, N. and Grosell, M., 2003. Iron acquisition by teleost fish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 13, 97-105.

Chen J.C., Hardy P.A., Kucharczyk W., Clauberg M., Joshi J.G., Vourlas A., Dhar M., Henkelman R.M., 1993. MR of human postmortem brain tissue: correlative study between T2 and assays of iron and ferritin in Parkinson and Huntington disease. *Neuroradiol.* 14, 275-281.

Chua, A.C.G., Graham, R.M., Trinder, D., Olynyk, J.K., 2007. The regulation of cellular iron metabolism. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 44, 413-459.

Crichton, R.R., Wilmet, S., Legssyer, R., Ward, R.J., 2002. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J Inorg Biochem.* 91, 9-18.

Crichton R.R., 2001. *Inorganic biochemistry of iron metabolism.* Wiley.

Cuajungco MP, Fagét KY, Huang X, Tanzi RE, Bush AI., 2000. Metal chelation as a potential therapy for Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 920, 292-304.

Dexter D.T., Carayon A., Javoy-Agid F., Agid Y., Wells F.R., Daniel S.E., Lees A.J., Jenner P., Marsden C.D., 1991. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain.* 114, 1953-1975.

Dexter D.T., Jenner P., Schapira A.H., Marsden C.D., 1992. Alterations in levels of iron, ferritin, and other trace metals in neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group. *Ann Neurol.* 32, 94-100.

Donovan, A., et al. 2002. The zebrafish mutant gene chardonnay (cdy) encodes divalent metal transporter 1 (DMT1). *Blood.* 100, 4655-4659.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Feather-Stone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 7, 88-95.

Feder JN, Gnirke A, Thomas W, et al., 1996. A novel MHC class 1-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. *Nat Genet.* 13, 399-408.

Fraenkel, P.G., Traver, D., Donovan, A., Zahrieh, D., Zon, L., 2005. Ferroportin 1 is required for normal iron cycling in zebrafish. *J Clin Invest.* 115, 1532-1541.

Fredriksson, A. & Archer, T., 2003. Effect of postnatal iron administration on MPTP-induced behavioral deficits and neurotoxicity: behavioral enhancement by L-Dopa-MK-801 co-administration. *Behav Brain Res.* 139, 31-46.

Fredriksson, A., Schröder, N., Eriksson, N., Izquierdo, I., Archer, T., 1999. Neonatal Iron Exposure Induces Neurobehavioural Dysfunctions in Adult Mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 159, 25-30.

Fredriksson, A., Schröder, N., Eriksson, N., Izquierdo, I., Archer, T., 2001. Neonatal Iron Potentiates adult MPTP-induced neurodegenerative and functional deficits. *Parkinsonism Relat Disord.* 7, 97-105.

Geiser D.L, Zhang D., Winzerling J.J., 2006 Secreted ferritin: mosquito defense against iron overload? *Insect Biochem Mol Biol.* 36(3):177-87.

Gerlai, R., Lee, V., Blaser, R., 2006. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult Zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacol Biochem Behav.* 85, 752-761.

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

Guo, S., 2004. Linking genes to brain, behavior and neurological disease what can we learn from zebrafish. *Genes Brain Behav.* 3, 63-74.

Guo, N., Garcia, M.M., Taylor, B.K., Zadina, J.E., Harlan, R.E., 2008. Blockade of micro-opioid receptors in the medial thalamus inhibits acquisition, but not expression, of morphine-induced conditioned place preference. *Neuroscience.* 151, 948-954.

Hasselbalch, S.G. & Kampmann, J.P., 2009. Treatment of degenerative dementia disorders - who should be treated? *Ugeskr Laeger.* 171, 802-805.

Herlenius, E., Lagercrantz, H., 2004. Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Exp Neurol.* 190, 8-21.

Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., & Peterson, R. E. 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci.* 86, 6-19.

Iron Criteria and Implementation for Iowa Surface Waters, RS. 11/28/2005 CD, 12/05/2005 CD.

Kaiser, R.R., Corrêa, M.C., Spanevello, R.M., Morsch, V.W., Mazzanti, C.M., Gonçalves, J.F., Schetinger, M.R., 2005. Acetylcholinesterase activation and enhanced lipid peroxidation after long-term exposure to low levels of aluminum on different mouse brain regions. *J Inorg Biochem.* 99, 1865-1870.

Lima, M.N., Laranja, D.C., Caldana, F., Graziotin, M. M., Garcia, V., Dal-Pizzol, F., Bromberg, E., Schröder, N., 2005a. Selengiline Protects against recognition memory impairment induced by neonatal iron treatment. *Exp Neurol.* 196, 177-183.

Lima, M.N., Polydoro, M., Laranja, D., Bonatto, F., Bromemberg, E., Moreira, J. C., Dal-Pizzol, F., Schröder, N., 2005b. Recognition memory impairment and brain oxidative stress induced by postnatal iron administration. *Eur J Neurosci.* 21, 2521-2528.

Lima, M.N., Dias, C., Torres, J, Dornelles, A., Garcia, V., Scalco, F., Guimarães, M.R., Petry, R., Bromberg, E., Constantino, L., Budni, P., Dal-Pizzol, F., Schröder, N., 2007. Reversion of Age-related recognition memory impairment by iron chelation in rats. *Neurobiol Aging.* 29, 1052-1059.

Lima, I. & Pedrozo, M., 2001. *Ecotoxicologia do ferro e seus compostos.* CRA, Salvador.

Lumsden, A., Henshall, T., Dayan, S., Lardelli, M., Richards, R., 2007. Huntingtin deficient zebrafish exhibit defects in iron utilization and development. *Hum Mol Genet.* 16, 1905-1920.

Nelson, P.T., Kryscio, R.J., Abner, E.L., Schmitt, F.A., Jicha, G.A., Mendiondo, M.S., Cooper, G., Smith, C.B., Markesbery, W.R., 2009. Acetylcholinesterase inhibitor treatment is associated with relatively slow cognitive decline in patients with Alzheimer's disease and AD + DLB. *J Alzheimers Dis.* 16, 29-34.

Njajou, O.T., Vaessen, N., Joosse, M., 2001. A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat. Genet.* 28, 213-214.

Oakley, A.E., Collingwood, J.F., Dobson, J., Love, G., Perrott, H.R., Edwardson, J.A., Elstner, M., Morris, C.M., 2007. Individual dopaminergic neurons show raised iron levels in Parkinson disease. *Neurology*. 68, 1820-1825.

Orhan, G., Orhan, I., Subutay-Oztekin, N., Ak, F., Sener, B., 2009. Contemporary anticholinesterase pharmaceuticals of natural origin and their synthetic analogues for the treatment of Alzheimer's disease. *Recent Pat CNS Drug Discov*.4, 43-51.

Park, E., Lee, Y., Kim, Y, Lee, C., 2008. Cholinergic modulation of neural activity in the telencephalon of the zebrafish. *Neurosci Lett*. 439, 79-83.

Rico, E.P., Rosenberg, D.B., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2007. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. *Toxicol Lett*. 174, 25-30.

Rico, E.P., Rosemberg, D.B., Senger, M.R., Arizi, M. B., Bernardi, G.F., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2006. Methanol alters ecto-nucleotidases and acetylcholinesterase in zebrafish brain. *Neurotoxicol Teratol*.28, 489-96.

Roex, E.W., Keijzers, R., van Gestel, C.A., 2003. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquat Toxicol*. 64, 451-460.

Rubinstein, A.L., 2003. Zebrafish from disease modeling to drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 6, 218-223.

Schröder, N., Fredriksson, A., Vianna, M., Roesler, R., Izquierdo, I., Archer, T., 2001. Memory deficits in adult rats following postnatal iron administration. *Behav Brain Res*. 124, 77-85.

Senger, M., Rosenberg, D., Rico, E., Arizzi, M., Dias, R., Bogo, M., Bonan, C., 2006. In Vitro Effect of Zinc and Cadmium on Acetylcholinesterase and Ectonucleotidase Activities in Zebrafish (*Danio rerio*) Brain. *Toxicol In Vitro*. 20, 954-958.

Storr, T., Merkel, M., Song-Zhao, G.X., Scott, L.E., Green, D.E., Bowen, M.L., Thompson, K.H., Patrick, B.O., Schugar, H.J., Orvig, C., 2007. Synthesis, characterization, and metal coordinating ability of multifunctional carbohydrate-containing compounds for Alzheimer's therapy. *J Am Chem Soc.* 129, 7453-7463.

Ward, R.J., Kuhn, L.C., Kaldy, P., Florence, A., Peters, T.J., Crichton, R.R., 1994. Control of cellular iron homeostasis by iron-responsive elements in vivo. *Eur J Biochem.* 220, 927-931.

Watanabe, T., Yamagata, N., Takasaki, K., Sano, K., Hayakawa, K., Katsurabayashi, S., Egashira, N., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M., 2009. Decreased acetylcholine release is correlated to memory impairment in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1249, 222-228.

Zecca, L., Youdim, M.B., Riederer, P., Connor, J.R., Crichton, R.R., 2004. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neuroscience* 5, 863-873.

Legends

Fig. 1 - *In vitro* effects of varying concentrations of iron (0,018, 0,268 or 2,6 mM) on zebrafish (A) brain AChE activity (45 ± 15 control values) and (B) liver AChE activity (4.4 ± 1.4 control values). Bars represent the mean \pm S.D. of at least five different experiments, each one performed in triplicate. The AChE activity was determined in μmol of thiocholine released per hour per milligram of protein. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey multiple range test. $*p < 0.05$ denotes a significant difference from the control group.

Fig. 2 - *In vivo* effects of acute treatment with iron (1, 15 or 150 mg/l) during 24 hours on zebrafish (A) brain AChE activity (41 ± 3.6 control values) and (B) liver AChE activity (6 ± 2.2 control values). Bars represent the mean \pm S.D. of at least five different experiments, each one performed in triplicate. The AChE activity was determined in μmol of thiocholine released per hour per milligram of protein. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey multiple range test. $*p < 0.05$ denotes a significant difference from the control group.

Fig. 3 – Effect of iron exposure (15 mg/L and 150 mg/L) during 24 hours on AChE transcripts from zebrafish brain (white bars) and liver (black bars). The PCR products were subjected to electrophoresis on a 1% agarose gel, using β -actin as constitutive gene. The figure shows a representative gel and the AChE/ β -actin mRNA ratio (expressed as arbitrary units) obtained by optical densitometry analysis of three independent experiments, with entirely consistent results. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey multiple range test. *Significantly different from control group.

Fig. 4 – Effect of iron exposure (15 mg/L and 150 mg/L) during 24 hours on iron content in zebrafish (A) brain tissue and (1.2 ± 0.4 control values) and (B) liver tissue (0.62 ± 0.13 control values). Bars represent the mean \pm S.D. of at least five different experiments. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey multiple range test. $*p < 0.05$ denotes a significant difference from the control group.

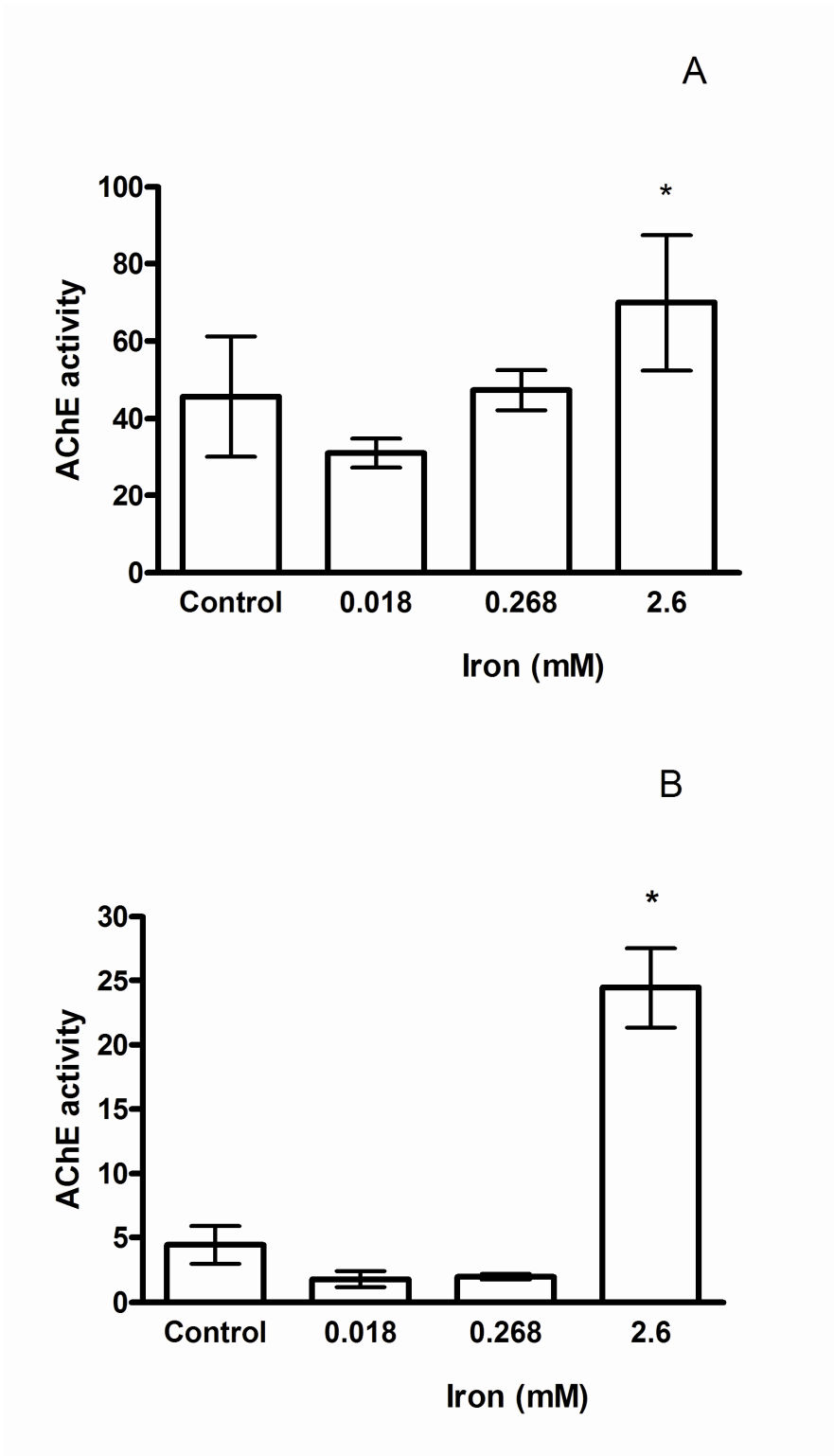


Figure 1

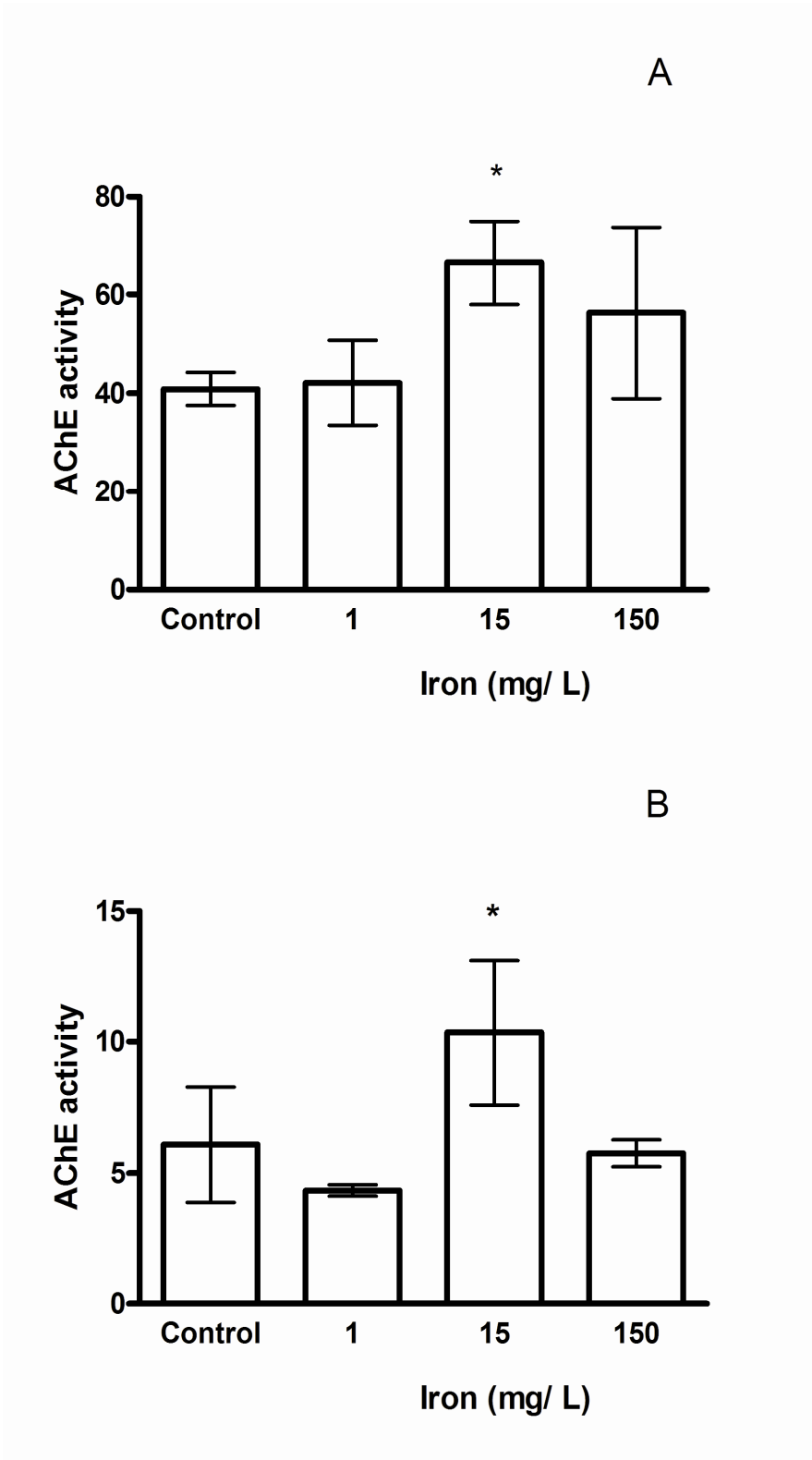


Figure 2

A

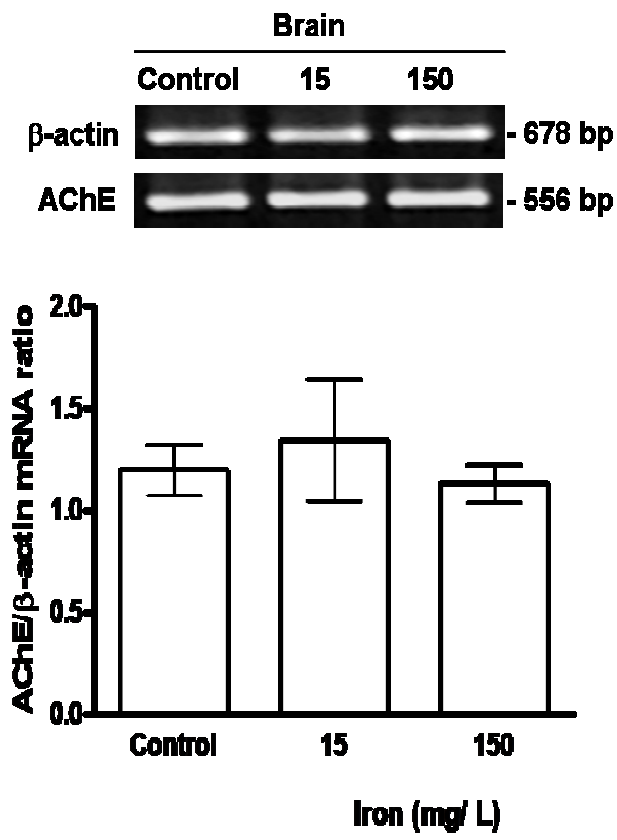


Figure 3A

B

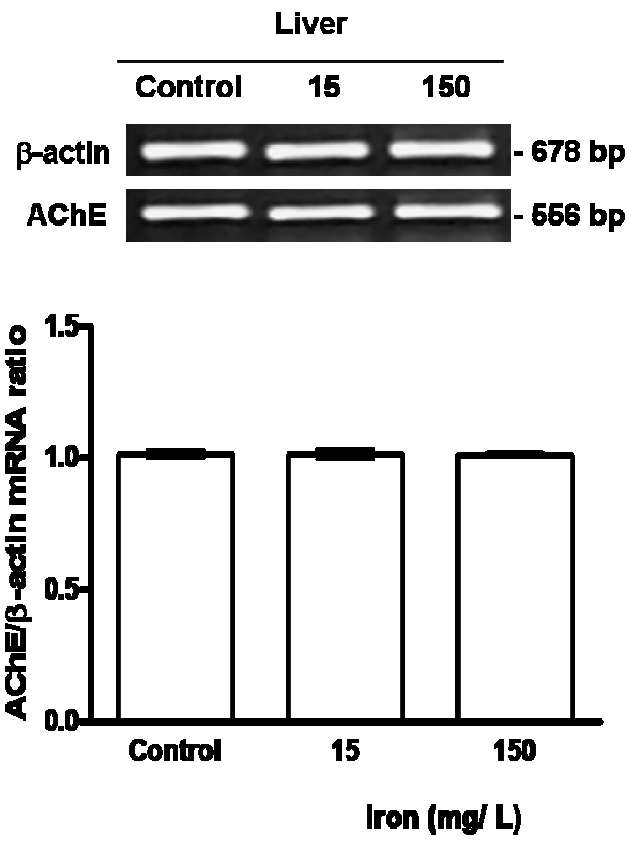


Figure 3B

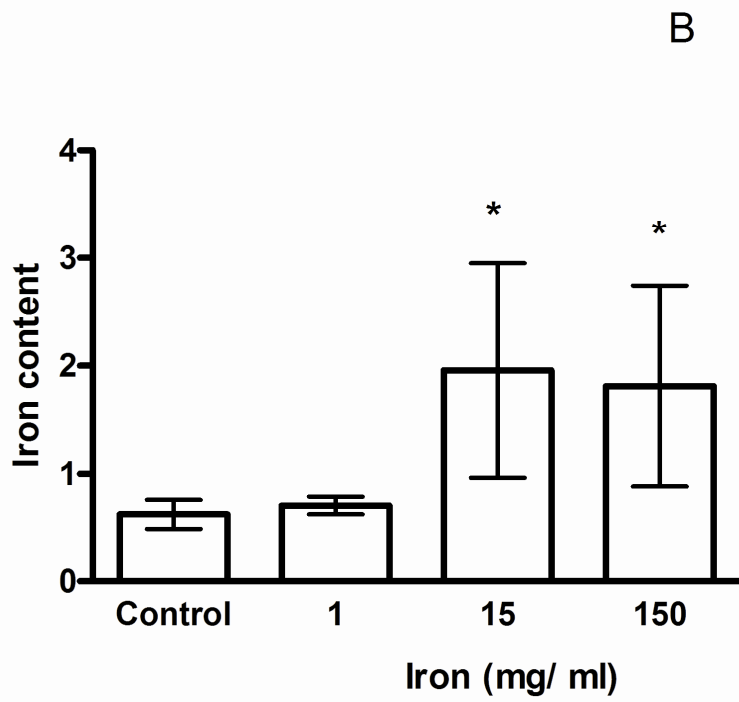
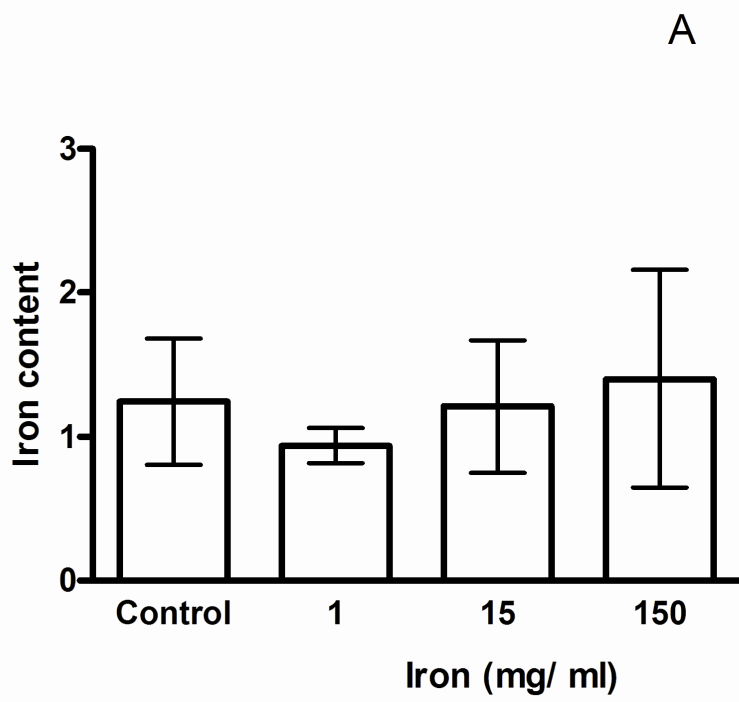


Figure 4

3- CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ferro é um metal amplamente distribuído na natureza (Bury, 2003). Sua presença em diversos organismos é fundamental para a sobrevivência. No entanto, a sua deficiência e o seu acúmulo podem ser prejudiciais à saúde, acarretando diversas doenças. Embora nos últimos anos tenham sido descobertos diversos genes envolvidos no controle da homeostase do ferro, o desafio continua sendo definir a atividade de cada um destes genes e entender as relações entre eles (Robson & Drakesmith, 2005).

No capítulo 2, avaliamos os efeitos *in vitro* e *in vivo* de diferentes concentrações de ferro sobre a atividade e a expressão do gene que codifica para acetilcolinesterase no cérebro e no fígado do zebrafish. Os resultados foram relacionados com o acúmulo deste metal nos tecidos após o tratamento de 24 horas. Foi demonstrado que o ferro é capaz de alterar a atividade da AChE nos ensaios *in vitro* em ambos os órgãos analisados, provocando um aumento da atividade, mostrando uma ação direta sobre a enzima. Neste sentido, foi demonstrado previamente na literatura que o emprego de quelantes de metais foi capaz de promover uma redução na atividade da AChE (Bolognesi et al, 2007).

Nos ensaios *in vivo*, foi observado um aumento da atividade da enzima no cérebro e no fígado. O aumento na atividade da AChE encontrado após a exposição ao ferro poderia ser consequência de controle transcricional e/ou modulação pós traducional. Por esta razão, foi analisada a expressão do gene que codifica para a AChE por RT-PCR semi-quantitativo. Os resultados obtidos mostram que a ativação encontrada na atividade da AChE não foi consequência de controle transcricional. Já foi demonstrado que a atividade da AChE em *Gallus gallus* durante a neurogênese (Robitzki et al., 1997) e diferenciação neuronal (Keller et al., 2001) é claramente regulada por um evento pós-traducional. Estudos com outros metais, como o alumínio, também demonstraram aumento na atividade da AChE em ratos.

Várias doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer, têm sido caracterizadas pelo déficit no sistema colinérgico (Orhan et al, 2009). Neste contexto, o uso de inibidores colinérgicos pode ser usado como tratamento para estas patologias (Anghelescu & Heuser, 2007; Hasselbalch & Kampmann, 2009). Estudos demonstraram a influencia do ferro nestas doenças sugerindo o uso de quelantes de metal no desenvolvimento de novos tratamentos (Storr et al., 2007; Cuajunco et al, 2000).

É comum nestas doenças a ocorrência de alterações comportamentais que incluem aprendizagem, memória e atividade locomotora. Schröder et al. (2001) demonstraram que ratos submetidos à administração de ferro no período pos-natal apresentaram déficit de memória na fase adulta. Outro estudo veio a complementar demonstrando que ratos submetidos ao ferro e ao MPTP apresentaram significativo déficit funcional e neuroquímico no processo neurodegenerativo do Parkinson (Fredriksson et al, 2001).

Avaliamos o acúmulo de ferro no cérebro e no fígado a fim de correlacionar com a atividade enzimática da AChE. Nós observamos que o conteúdo de ferro parece não estar relacionado diretamente com a atividade da AChE. Por outro lado, é possível que o acúmulo de ferro no fígado de zebrafish possa ser consequência de suscetibilidade diferente entre cérebro e fígado quando expostos ao ferro.

A próxima etapa deste projeto é avaliar o efeito da exposição às diferentes concentrações de ferro sobre a expressão de genes importantes para o metabolismo do ferro. Neste sentido, os genes DMT1 (proteína de absorção), que codifica a ferritina (de armazenamento), a ferroportina (de exportação) e a hepcidina (de regulação da homeostase do ferro) parecem constituir-se em ótimos candidatos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abboud, S., & Haile, D.J., 2000. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J. Biol. Chem.* 275, 19906–19912.

Andersen, O., 1997. Accumulation of waterborne iron and expression of ferritin and transferrin in early developmental stages of brown trout (*Salmo trutta*). *Fish Physiol. Biochem.* 16, 223–231.

Anghelescu, I. & Heuser, I., 2007. Acetylcholinesterase inhibitors for dementia-an update. *MMW. Fortschr. Med.* 149, 76-78.

Barbazuk, W.B., Korf, I., Kadavi, C., Heyen, J., Tate, S., Wun, E., Bedell, J.A., McPherson, J.D., Johnson, S.L., 2000. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* 10, 1351-1358.

Barillet, S., Adam, C., Palluel, O., Devaux, A., 2007. Bioaccumulation, oxidative stress and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environ. Toxicol. Chem.*, 26, 497-505.

Barrios, M.F., Gómez, H.G., Delgado, N.F., 2000. Metabolismo Del hierro. *Ver. Cubana Hematol. Hemoter.* 16, 149-160.

Baynes, J. & Dominiczak, M., 2007. *Bioquímica Médica*. Elsevier, éдика. Elsevier, RJ.

Beard, J.L., Dawson, H., Piñero, D.J., 1996. Iron metabolism: a comprehensive review. *Nutr. Rev.* 54, 295-317.

Behra, M., Cousin, X., Bertrand, C., Vonesch, J.L., Biellmann, D., Chatonnet, A., Strahle, U., 2002. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nat. Neurosci.* 2, 111-118

Bertrand, C., Chatonnet, A., Takke, C., Yan, Y.L., Postlethwait, J., Toutant J.P., Cousin, X., 2001. Zebrafish Acetylcholinesterase is encoded by a single gene localized on linkage group 7. *Journal of biological Chemistry.* 276, 464-474.

Boehmler, W., Obrecht-Pflumio, S., Canfiels, V., Thisse, C., Thisse, B., Levenson, R., 2004. Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. *Dev Dyn.* 230, 481-493.

Bolognesi, M.L., Cavalli, A., Valgimigli, L., Bartolini, M., Rosini, M., Andrisano, V., Recanatini, M., Melchiorre, C., 2007. Multi-target-directed drug design strategy: from a dual binding site acetylcholinesterase inhibitor to a trifunctional compound against Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 50, 6446-6449.

Bothwell, T.H., 1995. Overview and mechanism of iron regulation. *Nutr. Rev.* 53, 237-245.

- Bottino, C., Laks, J., Blay, S., 2006. Demência e Transtornos cognitivos em idosos. Guanabara koogan, RJ.
- Braga, J., Amancio, O., Vitalle, M., 2006. O ferro e a saúde das populações. Editora Roca, SP.
- Brethaud, S., Li Q, Lockwood BL, Kobayashi K, Lin E, Guo S, 2007. A choice behavior for morphine reveals experience-dependent drug preference and underlying neural substrates in developing larval zebrafish. *Neuroscience*. 146, 1109-1116.
- Bridges, K.R., 1992. Iron metabolism and sideroblastic anemia. In: Nathan, D.G., Oski, F.A., (eds.). *Hematology of infancy and Childhood*. 4, 391-412.
- Bury, N. and Grosell, M., 2003. Iron acquisition by teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 135, 97–105.
- Carney, S.A., Prasch, A.L., Heideman, W., Peterson, R.E., 2006. Understanding dioxin developmental toxicity using the zebrafish model. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 76, 7-18.
- Clemente, D., Porteros, A., Weruaga, E., Alonso, J.R., Arenzana, F.J., Aijon, J., Arevalo, R., 2004. Cholinergic elements in the zebrafish central nervous system: Histochemical and immunohistochemical analysis. *J. Comp. Neur.*, 474, 75-107.
- Couto, C., 2007. Doenças Hepáticas Metabólicas: Hemocromatose. *Prática Hospitalar*, ano IX, n. 54.
- Crichton R.R., 2001. *Inorganic biochemistry of iron metabolism*. Wiley.
- Cuajungco MP, Fagét KY, Huang X, Tanzi RE, Bush AI., 2000. Metal chelation as a potential therapy for Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 920, 292-304.
- Dallman, P.R., Siimes, M.A., Stekel, A., 1980. Iron deficiency in infancy and childhood. *Am. J. Clin.Nutr*. 33, 86-118.
- Dallman, P.R., 1992. Changing iron needs from birth through adolescence. In: Fomon, S.J., Zlotkin, S., *Nutritional Anemias*. Raven press. 30, 29-38.
- Dallman, P.R., Yip, R., Oski, F.A., 1992. Iron deficiency and related nutritional anemias. In: Nathan, S.G., Oski, F.A. (Eds). *Hematology of infancy and Childhood*. 4, 413-444.
- Derland, T & Dowling, J.E., 2001. Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish. *Proc Natl Acad*. 98, 11691-11696.
- Donovan, A., et al. 2000. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*. 403, 776–781.

Donovan, A., Brownlie, A., Dorschner, M., Zhou, Y., Pratt, S., Paw, B., Phillips, R., Thisse, C., Thisse, B., Zon, L. 2002. The zebrafish mutant gene *chardonnay* (*cdy*) encodes divalent metal transporter 1 (DMT1). *Blood*. 100, 4655-4659.

Edwards JG, Michel WC., 2002. Odor-Stimulated glutamatergic neurotransmission in the zebrafish olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 454, 294-309.

Fernandez, L., Fornari, L.H., Barbosa, M., Schroder, N., 2007. Iron and Neurodegeneration. *Scientia Medica*. 17, 218-224.

Fraenkel, P., Traver, D., Donovan, A., Zahrieh, D., 2005. Ferroportin 1 is required for normal iron cycling in zebrafish. *The Journal of Clinical Investigation*. 115, 1532-1541.

Frazer, D.M., Wilkins, S.j., Becker, E.M., Murphy, T.L., Vulpe, C.D., McKie, A.T., Anderson, G.J., 2003. A rapid decrease in the expression of DMT1 and *Dcytb* but not *Ireg1* or hephaestin explains the mucosal block phenomenon of iron absorption. *Gut*. 3, 340-346.

Frazer, D.M. & Anderson, G.J., 2003. The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues? *Blood. Cells. Dis.* 30, 288-297.

Fredriksson, A, Schröder, N, Eriksson, N, Izquierdo, I, Archer, T., 2001. Neonatal Iron Potentiates adult MPTP-induced neurodegenerative and functional deficits. *Parkinsonism and related disorders*. 7, 97-105.

Gaitonde, D., Sarkar, A., Kaisary, S., Silva, C.D., Dias, C., Rao, D.P., Ray, D., Nagarajan, R., Sousa, S.N., Sarker, S., Patill, D., 2006. Acetylcholinesterase activities in marine snail (*Cronia contracta*) as a biomarker of neurotoxic contaminants along the Goa coast, West coast of India. *Ecotoxicology*. 15, 353-358.

Gerlai, R., Lahav, S., Guo, S., Rosenthal, A., 2000. Drinks like a fish: zebrafish (*danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 67, 773-782.

Gerlai, R., Lee, V., Blaser, R., 2006. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*danio rerio*). *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 85, 752-761.

Girelli, D., Domenico, I., Bozzini, C., Campostrini, N., Busti, F., Castagna, A., Soriani, N., Cremonesi, L., Ferrari, M., Colombari, R., McVey Ward, D., Kaplan, J., Corrocher, R., 2008. Clinical, pathological, and molecular correlates in ferroportin disease: a study of two novel mutations. *J Hepatol*. 49, 664-671.

Goel, A., Chauhan, D.P., Dhawan, D.K., 2000. Protective effects of zinc in chlorpyrifos induced hepatotoxicity: a biochemical and trace elemental study. *Biol Trace Elem Res*. 74, 171-183.

Goldsmith, P., 2004. Zebrafish as a pharmacological tool: The how, why and when. *Current Opinion in Pharmacology*, 4, 504-512.

- Grosell, M., Wood, C.M., 2002. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *J. Exp. Biol.* 205, 1179-1188.
- Grotto, H., 2008. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 30, 390-397.
- Guo, S., 2004. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish ? *Genes, Brain and behavior.* 3, 63-74.
- Hagar, W., Theil, E.C., Vichinsky, E.P., 2002. Diseases of iron metabolism. *Pediatr. Clin. N. Am.* 49, 893-909.
- Hallberg, L., 1981. Bioavailability of dietary iron in man. *Ann. Rev. Nutr.* 1, 123-147.
- Harmatz, P., Butensky, E., Quirolo, K., Williams, R., Ferrell, L., Moyer, T., 2000. Severity of iron overload in patients with sickle cell disease receiving chronic red blood cell transfusion therapy. *Blood.* 96, 76-79.
- Hasselbalch, S.G. & Kampmann, J.P., 2009. Treatment of degenerative dementia disorders--who should be treated? *Ugeskr. Laeger.* 171, 802-805.
- Heideman, W., Antkiewicz, D. S., Carney, S. A., Peterson, R. E., 2005. Zebrafish and cardiac toxicology. *Cardiovascular Toxicology.* 5, 203-214.
- Henry, M.G. & Atchinson, G.J., 1984. Behavioral effects of methylparathion on social groups of bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 3, 399-408.
- Herlenius, E. & Lagercrantz, H., 2004. Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Exp Neurol.* 190, 8-21.
- Hill, A., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R., 2005. Zebrafish as a model vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicological Sciences,* 86, 6-19.
- Hofmann, W.K., Ottmann, O.G., Ganser, A., Hoelzer, D., 1996. Mielodysplastic syndromes: clinical features. *Semin. Hematol.* 33, 177-185.
- Hörl, W. New insights into intestinal iron absorption, 2008. *Nephrol Dial Transplant.* 10, 3063-3064.
- Howland, R. & Mycek, M., 2007. *Farmacologia Ilustrada.* Artmed, SP.
- Jellinger, K.A., 1999. The Role of Iron in neurodegeneration: prospects for pharmacotherapy of Parkinson's disease. *Drugs Aging,* (14): 115-140.
- Kaslin, J. & PANULA, P., 2001. Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol.* 440, 342-377.
- Ke, Y. & Qian, Z.M., 2003. Iron Misregulation in the brain: a primary cause of neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 2, 246-253.

- Keller, M., Robitzki, A., Layer, P.G., 2001. Heterologous expression of acetylcholinesterase affects proliferation and glial cytoskeleton of adherent chicken retinal cells. *Cell Tissue Res.* 306, 187–198.
- Kim, Y. J., Nam, R. H., Yoo, Y. M., Lee, C. J., 2004. Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci. Lett.* 355, 29-32.
- Koeppen, A.H., 1995. The history of iron in the brain. *J. Neurol. Sci.*134, 1-9.
- Kucenas, S., Li, Z., Cox, J.A., Egan, T., Voigt, M.M., 2003. Molecular characterization of the zebrafish P2X receptor subunit gene family. *Neuroscience.* 121, 935-945.
- Kumar, A., Chapman, J.C., 1998. Profenofos toxicity to the eastern rainbow fish (*Melanotaenia duboulayi*). *Environ.Toxicol. Chem.* 17, 1799-1806.
- Lanzky, P. F., & Halling-Sorensen, B. (1997). The toxic effect of the antibiotic metronidazole on aquatic organisms. *Chemosphere.* 35, 2553–2561.
- Labrot, F., Narbonne, J. F., Ville, P., Saint Denis, M., Ribera, D., 1999. Acute toxicity, toxicokinetics, and tissue target of lead and uranium in the clam *Corbicula fluminea* and the worm *Eisenia fetida*: Comparison with the fish *Brachydanio rerio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 167–178.
- Latunde-Dada, G.O., Van der Westhuizer, J., Vulpe, C.D., Anderson, G.J., Simpson, R.J., McKie, A.T., 2002. Molecular and functional roles of duodenal cytochrome B (Dcytb) in iron metabolism. *Blood. Cell. Mol. Dis.* 29, 356-360.
- Legierse, K.C.H.M., 1998. Differences in sensitivity of aquatic organisms to organophosphorus pesticides. Ph.D. thesis, University of Utrecht.
- Leong, W.I. & Lönnerdal, B., 2004. Hepcidin, the recently identified peptide that appears to regulate iron absorption. *J. Nutr.* 134, 1-4.
- Lieschke, G.J., Currie, P.D., 2000. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* 8, 353-367.
- McKie, A.T., et al. 2000. A novel duodenal iron regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol.Cell.* 5, 299–309.
- McKie, A.T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D. et al., 2000. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol. Cell.* 5, 299-309.
- Motta, V., 2005. Bioquímica. EDUCS.
- Orhan, G., Orhan, I., Subutay-Oztekin, N., Ak, F., Sener, B., 2009. Contemporary anticholinesterase pharmaceuticals of natural origin and their synthetic analogues for the treatment of Alzheimer's disease. *Recent. Pat. CNS. Drug. Discov.* 4, 43 51.

Parng, C., Seng, W., Semino, C., & McGrath, P., 2002. Zebrafish: A preclinical model for drug screening. *Assay and Drug Development Technologies*, 1, 41–48.

Parng, C., 2005. In vivo zebrafish assays for toxicity testing. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 8, 100–106. *Toxicological Sciences*. 86, 6–19.

Polla, A.S., Polla, L.L., Polla, B.S., 2003. Iron as the malignant spirit in successful ageing. *Ageing res. Rev.* 2, 25-37.

Poss, K.D. & Tonegawa, S., 1997. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 10919-10924.

Powell, L. W., Campbell, C.B., Wilson, E., 1970. Intestinal mucosal uptake of iron and iron retention in idiopathic haemochromatosis as evidence for a mucosal abnormality. *Gut*. 11, 727–731.

Remacha, A.F. & Arrizabalaga, B., 2002. Utilidad clínica del receptor de la transferrina. *Hematologica*. 87, 322-332.

Rico, E.P, Rosemberg, D.B, Senger, M.R, Arizi M.B, Bernardi, G.F, Bogo, M.R; Bonan, C.D., 2006. Methanol alters ecto-nucleotidases and acetylcholinesterase in zebrafish brain. *Neurotoxicol teratol.* 28, 489-496.

Rico, E.P, Rosenberg, D.B, Dias, R.D, Bogo, M.R, Bonan, C.D., 2007. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. *Toxicol. let.* 174, 25-30.

Rink, E. & Guo, S., 2004. The too few mutant selectively affects subgroups of monoaminergic neurons in the zebrafish forebrain. *Neuroscience*. 127, 147-154.

Robitzki, A., Mack, A., Chatonnet, A., Layerm, P.G., 1997. Transfection of reaggregating embryonic chicken retinal cells with an antisense 5'-DNA butyrylcholinesterase expression vector inhibits proliferation and alters morphogenesis. *J. Neurochem.* 69, 823–833.

Robson, K. & Drakesmith, H., 2005. Multifactorial Iron Man. *Digestion*. 72, 22–24

Roche, H., Boge, G., Peres, G., 1994. Acute and chronic toxicities of colchicine in *Brachydanio rerio*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 69–73.

Roeder, M. & Roeder, R. H., 1966. Effect of iron on the growth rate of fishes. *J. Nutr.* 90, 86–90.

Roex, E, Keijzers, R, Gestel, AM., 2003. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *danio rerio*, after chronic exposure to parathion. *Aquatic toxicology*. 64, 451-460.

Rolfs, A. & Heidiger, M.A., 1999. Metal ion transporters in mammals: structure, function and pathological implications. *J. Physiol.* 518, 1-12.

Rosenberg, D.B., Rico, E.P.; Senger, M.R.; Arizi, M.B., Dias, R.D, Bogo, M.R.; Bonan, C.D., 2007. Acute and subchronic copper treatments alter extracellular nucleotide hydrolysis in zebrafish brain membranes. *Toxicology.* 236, 132-139.

Schröder, N., Fredriksson, A., Vianna, M., Roesler, R., Izquierdo, I., Archer, T., 2001. Memory deficits in adult rats following postnatal iron administration. *Behavioural Brain Research.* 124, 77-85.

Senger, M., Rico E.; Arizi, M., Rosenberg, D.B., Dias, R., Bogo, M., Bonan, C., 2005. Carbofuran and Malathion Inhibit Nucleotide Hydrolysis in Zebrafish (*Danio rerio*) Brain Membranes. *Toxicology.* 212, 107-115.

Senger, M., Rosenberg, D., Rico, E., Arizi, M., Dias, R., Bogo, M., Bonan, C., 2006a. In Vitro Effect of Zinc and Cadmium on Acetylcholinesterase and Ectonucleotidase Activities in Zebrafish (*Danio rerio*) Brain. *Toxicology in Vitro* 20, 954-958.

Senger, M.R, Rico, E., Arizzi, M, Frazzon, A.P, Dias, R.D, Bogo, M.R, Bonan, C.D., 2006b. Exposure to Hg²⁺ and Pb²⁺ changes NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in central nervous system of zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology.* 226, 229-37.

Silva, R., Richetti, S., Silveira, V., Battastini, A., Bogo, M., Lara, D., Bonan, C. 2008. Maternal caffeine intake affects acetylcholinesterase in hippocampus of neonate rats. *Int. J. Devl Neuroscience.* 26, 339-343.

Stern, H.M. & Zon, L.I., 2003. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nature Rev. Cancer* 3, 1-7.

Storr, T., Merkel, M., Song-Zhao, G.X., Scott, L.E., Green, D.E., Bowen, M.L., Thompson, K.H., Patrick, B.O., Schugar, H.J., Orvig, C., 2007. Synthesis, characterization, and metal coordinating ability of multifunctional carbohydrate-containing compounds for Alzheimer's therapy. *J Am Chem Soc.* 129, 7453-7463.

Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D. & Singer, F., 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*brachydanio rerio*). *Nature.* 291, 293-296.

Van der Wel, H. & Welling, W., 1989. Inhibition of acetylcholinesterase in guppies (*Poecilia reticulata*) by chlorpyrifos at sublethal concentrations: methodological aspects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 17, 205-215.

Vascotto, S.G, Beckham, Y, Kelly, G.M., 1997. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochem Cell Biol,* 75, 479-485.

Youdim, M.B.H., Fridkin, M., Zheng, H., 2005. Bifunctional drug derivatives of MAO-B inhibitor rasagiline and iron chelator VK-28 as a more effective approach to treatment of brain ageing and ageing neurodegenerative diseases. *Mech Ageing Dev.* 126, 317-326.

Ward, R.J., Kuhn, L.C., Kaldy, P., Florence, A., Peters, T.J., Crichton, R.R., 1994. Control of cellular iron homeostasis by iron-responsive elements In vivo. *Eur J Biochem.* 220, 927–931.

Wingert, R.A., et al. 2004. The chianti zebrafish mutant provides a model for erythroid-specific disruption of transferrin receptor 1. *Development.* **131**:6225–6235.

Winkler, J., Thal, L.J., Gage, F.H.; Fisher, L.J., 1998. Cholinergic strategies for Alzheimer's disease. *Mol Med.* 76, 555-567.

Zecca, L., Youdim, M.B., Riederer, P., Connor, J.R., Crichton, R.R., 2004. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 863-873.

Zok, S., Gorge, G., Kalsch, W., and Nagel, R., 1991. Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Sci. Total Environ.* 109, 411–421.

ANEXO 1: COMPROVANTE DE APROVAÇÃO PELO CEUA

I



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS



Ofício 033/08-CEUA

Porto Alegre, 12 de maio de 2008.

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética para o Uso de Animais avaliou seu protocolo de pesquisa intitulado: **"Zebrafish (Danio rerio) como modelo para estudo da neurotoxicidade induzida por ferro"** e, solicita retornar com modificações com as observações em anexo, feitas pelo CEP-PUCRS.

Solicitamos responder as questões abaixo e, qualquer modificação feita no texto do projeto ou em outro documento, deverá ser indicada com número da página e linha.

Atenciosamente,


Prof. Dra. Anamaria Feijó
COORDENADORA DO CEUA-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Prof Mauricio Reis Bogo
N/Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 – 3º andar sala 314- CEP: 90610-000
Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: ceua@pucrs.br

ANEXO 2

De: Editorial Express Mail System [mailto:ee_mailer@editorialexpress.com] Em nome de
Comp Biochem Physiol Edit. Office
Enviada em: Friday, June 05, 2009 12:33 PM
Para: Mauricio Reis Bogo
Assunto: CBP: manuscript 17191 received

Dear Dr. Bogo:

Thank you for your submission, ms.17191, entitled
"Iron-induced modulation of acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain
and liver" which was received on June 3, 2009.

Please refer to the manuscript number, ms.17191, in any future correspondence concerning
your submission.

You can check the status of your submission at any time by visiting
the url below; this url has a security password so that
only you will be able to access the status info on your submission).

<https://editorialexpress.com/s.cgi?i=8a3cd6140771771e3319e8bdca3eb62f>

Alternatively, you can contact the CBP Editorial Office directly
by email at <cbpjrn@editorialexpress.com> to inquire about the status of your
submission.

Your manuscript will be sent to external reviewers shortly and we will communicate with
you again as soon as we have received feedback from the reviewers.

If you have any questions, please let us know, anytime.

Sincerely,

(Ms.) Leslie Lighthouse
Managing Editor

CBP Editorial Office
Comparative Biochemistry and Physiology
<cbpjrn@editorialexpress.com>