

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

KATIUCIA CAPIOTTI

**Avaliação do modelo de hiperargininemia sobre parâmetros neuroquímicos,  
moleculares e comportamentais em peixe-zebra (*Danio rerio*): uma abordagem sobre o  
sistema purinérgico.**

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr. Carla Denise Bonan

Porto Alegre

2012

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

KATIUCIA MARQUES CAPIOTTI

**Avaliação do modelo de hiperargininemia sobre parâmetros neuroquímicos,  
moleculares e comportamentais em peixe-zebra (*Danio rerio*): uma abordagem sobre o  
sistema purinérgico.**

Autor

**Katiucia Marques Capiotti**

Orientador

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carla Denise Bonan**

Porto Alegre

2012

KATIUCIA MARQUES CAPIOTTI

**Avaliação do modelo de hiperargininemia sobre parâmetros neuroquímicos,  
moleculares e comportamentais em peixe-zebra (*Danio rerio*): uma abordagem sobre o  
sistema purinérgico.**

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.

Autor

**Katiucia Marques Capiotti**

Orientador

**Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Carla Denise Bonan**

Porto Alegre

2012

## AGRADECIMENTOS

Em especial dedico essa dissertação à minha vó Elisabeth Severo Capiotti, que sempre esteve ao meu lado me dando carinho, apoio, amor e incentivo nos estudos e nas escolhas da vida.

Aos meus pais, Glória Maria Marques Capiotti e Emival Severo Capiotti, pelo amor e compreensão durante todo esse percurso.

À minha irmã, Karine Marques Capiotti, por todas as conversas incentivadoras e pela frase dita no sofá de casa: “Às vezes as pessoas desistem e faltava apenas um pouco para chegar onde elas queriam...”.

Ao meu avô e minha avó Hernani Marques e Dinah dos Santos Marques, por todo amor e dedicação desde meus primeiros anos na escola.

Ao meu querido avô, Edgar Capiotti, que sempre me apóia e incentiva meus projetos de vida.

Ao meu “namorado” Gabriel Moser Torres, por toda compreensão, amor e carinho desses anos, pelas infinitas conversas e participações dessa dissertação.

À minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Carla Denise Bonan, que além de orientadora foi mãe e amiga. Agradeço de coração por ter tido a oportunidade de estar ao lado dessa excelente profissional. Muito obrigada pela paciência, dedicação, conselhos e ensinamentos nesses anos de convívio.

À minha amiga e também orientadora Prof<sup>ª</sup>. Rosane Souza da Siva, que não tenho palavras para dizer o quanto é essencial em minha vida. Obrigada por tudo.

Ao querido Prof. Renato Dutra Dias, por todos os conselhos e ensinamentos que levarei para vida.

À Prof<sup>ª</sup>. Mônica Vianna, pelo carinho, disponibilidade, incentivo e amizade.

Aos professores do Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso e Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul por toda cooperação.

Aos meus colegas do Laboratório em especial a Lidiane Fazenda e a Luiza Nazario, que me ajudaram muito durante os experimentos.

Aos meus amigos e colegas Fabiano Perez Menezes, Eduardo Rico e Denis Rosemberg por todas as risadas, estudos e discussões.

As minhas amigas Martina Blanck e Stefânia Richetti, que me deram apoio profissional e emocional para ir atrás dos meus objetivos.

As “Lauras” Guerim e Nery, pelas risadas e conversas abstratas necessárias nesse período.

Aos meus amigos José Ricardo Barradas, Bianca Cognato, Chalissa Wachholz e Fernanda Borba pelo carinho, amor e compreensão em todos os momentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da PUCRS pela contribuição na minha formação.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

## RESUMO

Hiperargininemia é uma doença rara causada por um erro inato do metabolismo (EIM) bioquimicamente caracterizado pelo acúmulo de arginina nos tecidos devido à deficiência de arginase. Retardo mental e outras doenças neurológicas são sintomas comuns em pacientes hiperargininêmicos. Diversos mecanismos foram propostos para descrever a neurotoxicidade da hiperargininemia, tais como, alterações nos sistemas enzimáticos antioxidantes e de neurotransmissão. O sistema purinérgico é uma importante rota de sinalização celular que utiliza nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares como moléculas sinalizadoras. A degradação do ATP extracelular é realizada por uma família de enzimas localizadas na superfície celular conhecidas como ectonucleotidases, que inclui as NTPDases (nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases) e a ecto-5'-nucleotidase. A adenosina é um neuromodulador que atua através da ativação de receptores metabotrópicos do tipo P1 ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$ ,  $A_3$ ) e pode agir como um neuroprotetor endógeno. As NTPDases hidrolisam nucleotídeos tri- e difosfatados originando a adenosina. Assim, as NTPDases e ecto-5'-nucleotidase controlam os níveis de nucleotídeos e nucleosídeos, modulando o sistema purinérgico. Considerando que o peixe-zebra é uma importante ferramenta para o estudo da Biologia do Desenvolvimento e que a hiperargininemia é uma doença que ocorre nas fases iniciais do desenvolvimento, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamento com arginina em larvas de peixe-zebra em diferentes parâmetros bioquímicos, comportamentais e moleculares. Foram avaliados os efeitos da exposição *in vivo* de larvas e adultos de peixe-zebra na atividade das ectonucleotidases e na locomoção. Os resultados obtidos demonstraram que a exposição à arginina na concentração de 0.1 mM em larvas de peixe-zebra do 3º ao 7º dia pós-fertilização (dpf) foi capaz de alterar a atividade das ectonucleotidases, promovendo um aumento na hidrólise de ATP, ADP e AMP, assim como causar alterações moleculares e morfológicas, como diminuição do tamanho corporal, porém não alterou a atividade locomotora dos animais. A exposição aguda (1h) a arginina em peixes zebra adultos não foi capaz de alterar a atividade das ectonucleotidases. Esses dados demonstram que a arginina pode afetar a atividade das ectonucleotidases e parâmetros morfológicos em larvas de peixe-zebra, sugerindo que o sistema purinérgico é um alvo para os efeitos neurotóxicos induzidos pela arginina, nas fases iniciais do desenvolvimento.

Palavras-chaves: Arginina, Desenvolvimento, Ectonucleotidases, Hiperargininemia, Larvae, Toxicidade, Peixe-zebra.

## ABSTRACT

Hyperargininemia is a rare disease caused by an innate error of the metabolism (EIM) biochemically characterized by the accumulation of arginine in body tissues due to arginase deficits. Mental retardation and other neurological symptoms are common in hyperargininemic patients. Several mechanisms have been proposed to describe the neurotoxicity of hiperargininemia, such as changes in antioxidant enzyme systems and neurotransmission. The purinergic system is an important pathway for which uses extracellular nucleotides and nucleosides as signaling molecules. The extracellular ATP degradation and the consequent adenosine production are performed by a cellular surface enzyme family known as ectonucleotidases, which include the NTPDases (nucleoside triphosphate diphosphohydrolases) and the ecto-5'-nucleotidase.

Adenosine is a neuromodulator that acts through the activation of P1 metabotropic receptors (A1, A2A, A2B, A3) and plays a role as an endogenous neuroprotector. Thus, the NTPDase and ecto-5'-nucleotidase control the levels of nucleotides and nucleosides, modulating the purinergic system. Whereas the zebrafish is an important tool for the study of developmental biology and the hiperargininemia is a disease that occurs in the early stages of development, the objective of this study was to evaluate the effects of arginine exposure in zebrafish larvae on different biochemical, behavioral, and molecular parameters. The results showed that exposure to arginine at a concentration of 0.1 mM in larvae of the zebrafish from 7 days post-fertilization (dpf) was capable of changing ectonucleotidase activities, promoting an increase of ATP, ADP, and AMP hydrolysis and as causing morphological changes, such as larvae body size reduction, but did not alter the locomotor activity of animals. Acute arginine exposure (1h) in adult zebrafish was not able to alter the activity of ectonucleotidases. These data demonstrate that arginine can affect the ectonucleotidase activities and morphological parameters in zebrafish larvae, suggesting that the purinergic system is a target for neurotoxic effects induced by arginine in the early stages of developmental.

**Keywords:** Arginine, Development, Ectonucleotidases, Hyperargininemia, Larvae, Toxicity, Zebrafish.

## LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA: acetil-coenzima A

Arg: arginina

ARG1: arginase I

ARG2: arginase II

ADA: adenosina desaminase

ADP: adenosina 5'- difosfato

AMP: adenosina 5'- monofosfato

AMPC: adenosina 5'- monofosfato cíclico

ATP: adenosina 5'- trifosfato

Ca<sup>2+</sup>: cálcio

EIM: erro inato do metabolismo

E-NPP: ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase

GPI: glicosilfosfatidilinositol

K<sup>+</sup>: potássio

Na<sup>+</sup>: sódio

NTPDase: nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

SNC: sistema nervoso central

SNP: sistema nervoso periférico

Rh: Proteína Rhesus

TU: Transportadores de uréia



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Peixe-zebra ( <i>Danio rerio</i> ).....	11
<b>Figura 2:</b> Embrião e larva de peixe-zebra ( <i>Danio rerio</i> ).....	13
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática do modelo de Erro inato do metabolismo.....	18
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática da sinalização purinérgica.....	22
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática da degradação extracelular dos nucleotídeos derivados de purinas.....	25

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>1. CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>10</b>
1. INTRODUÇÃO .....	11
1.1 PEIXE-ZEBRA .....	11
1.2 HIPERARGININEMIA .....	16
1.3 SISTEMA PURINÉRGICO .....	18
1.3.1 ATP .....	18
1.3.1 ADENOSINA .....	20
1.3.2 ECTONUCLEOTIDASES .....	22
1.4 SISTEMA PURINÉRGICO E HIPERARGININEMIA .....	25
JUSTIFICATIVA.....	26
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
1.6 OBJETIVOS GERAIS .....	27
1.7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>2. CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>28</b>
2.1 COMPROVANTE SUBMISSÃO DO ARTIGO .....	29
2.2 ARTIGO CIENTÍFICO .....	30
<b>3. CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>53</b>
3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	54
<b>4. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>
<b>5. ANEXOS .....</b>	<b>70</b>
5.1 COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO PROTOCOLO PELO COMITÊ DE ÉTICA DA PUCRS.....	71
5.2 OUTRAS PUBLICAÇÕES DURANTE O MESTRADO .....	72

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PEIXE-ZEBRA

O peixe-zebra, *Danio rerio* (Figura 1), pertence à família dos peixes de água doce Cyprinidae, que representa a família de vertebrados com o maior número de espécies (Nelson, 1994), sendo as espécies do gênero *Danio* naturalmente endêmicas do sul e sudeste asiático, principalmente Índia, Bangladesh e Nepal. O nome *Danio* é derivado da palavra Bengali “*dhani*”, que significa “do campo de arroz” (Talwar & Jhingran, 1991).



**Figura 1:** *Danio rerio*. Disponível em [www.aquamundi.com.br/zebrafish](http://www.aquamundi.com.br/zebrafish).

Esse peixe é caracterizado por seu tamanho pequeno (até 12 cm de comprimento), raramente excede o tamanho padrão de 4 cm da ponta do focinho até a origem da nadadeira caudal. O padrão de coloração distinto, baseado em listras horizontais, claras e escuras e alternadas (Spence et al., 2008) compreende três tipos de células pigmentares, ou cromatóforos: os melanóforos azul-escuros, os xantóforos dourados e os iridóforos iridescentes (Parichy, 2006a). Assim como na maioria dos teleósteos, os melanóforos podem ser concentrados ou dispersados em resposta aos estímulos, sendo úteis na camuflagem, em resposta a alterações na luminosidade (Guo, 2004), além de serem úteis para a demonstração de agressividade, medo e outras situações comportamentais (Larson et al., 2006). Os machos

e as fêmeas apresentam coloração semelhante, embora os machos apresentem nadadeiras anais maiores e coloração mais amarelada em relação às das fêmeas (Schilling, 2002). O peixe-zebra é uma espécie onívora, se alimentando principalmente de zooplâncton e insetos, além de fitoplâncton, algas filamentosas, ovos de invertebrados, aracnídeos e detritos (Spence et al., 2007a).

Atualmente, o peixe-zebra vem sendo cada vez mais utilizado em estudos nas áreas de bioquímica, farmacologia, toxicologia, neurobiologia, fisiologia (Zon & Peterson, 2005; Senger et al., 2006; Seibt et al., 2009; Egan et al., 2009; Grossman et al., 2010; Lee et al., 2010). Além disso, diversos modelos de doenças humanas como, por exemplo, doenças neurológicas, cardíacas e câncer já foram desenvolvidos em peixe-zebra (Finn et al., 2009; Xi et al., 2011; Dahme et al., 2009; Hortopan et al., 2010, Etchin et al., 2011).

Inicialmente, o peixe-zebra foi empregado no estudo da genética do desenvolvimento e genética molecular, devido a vantagens apresentadas quando comparado a outros organismos (Feitsma et al, 2008). Seus embriões (Figura 2) são suficientemente resistentes a manipulações experimentais como microinjeção e transplante celular (Gilmour et al., 2002). Além disso, a transparência desses embriões permite a visualização dos processos do desenvolvimento nos seus diferentes estágios e também o *screening* por fenótipo (Lieschke & Currie, 2007). O ciclo de desenvolvimento do peixe-zebra é bastante rápido, sendo que a embriogênese possui uma duração aproximada de 24 horas e a organogênese leva em torno de cinco dias (Dahm & Geisler, 2006). Outro atrativo para o uso do peixe-zebra é sua capacidade de gerar um grande número de descendentes. Quando mantida em condições ideais, uma fêmea pode gerar de 100 a 400 ovos por dia (Dahm & Geisler, 2006), sendo esses ovos relativamente grandes em relação a outros peixes (0,7 mm no momento da fertilização). Suas características embriológicas e de desenvolvimento conferem ao peixe-zebra grande vantagem em relação a outros modelos de vertebrados, nos quais aspectos patológicos e da

organogênese não podem ser estudados sem intervenções cirúrgicas ou análises *post-mortem* (Lieschke & Currie, 2007). Os avanços nos estudos com peixe-zebra ainda permitem *screening* genéticos em larga escala que tornaram possível entender processos específicos de vertebrados. Anteriormente, esse tipo de estudo era restrito a moscas, vermes e fungos (Zon & Peterson, 2005). Além disso, o rápido desenvolvimento desse teleósteo permite o estudo de aspectos do desenvolvimento como proliferação e crescimento celular, organogênese, locomoção e comportamento em apenas algumas horas ou dias (Dahm & Geisler, 2006).

A



B



**Figura 2:** Estágio embrionário com 24h (A) e larval com 7 dias pós-fertilização do peixe-zebra (B). Disponível em [www.zfin.org](http://www.zfin.org).

Em estudos farmacológicos, sua capacidade de absorver compostos adicionados à água dispensa a necessidade de tratamentos através de protocolos invasivos. Uma vez que as larvas de peixe-zebra podem viver em meios com volume em torno de 50  $\mu$ l, pouca quantidade de droga é necessária para a realização de testes (Goldsmith, 2004). Essas características permitem a realização de estudos *in vivo* em larga escala e também a replicação do tratamento em um grande número de animais, bem como em diferentes linhagens (Berghmans et al., 2007).

O estudo do genoma do peixe-zebra foi iniciado em 2001 com o seqüenciamento pelo Instituto Sanger (Spence et al., 2008). O genoma da espécie foi seqüenciado e estão sendo feitas revisões e atualizações em sua anotação ([sanger.ac.uk/Projects/D\\_rerio](http://sanger.ac.uk/Projects/D_rerio)). Muitos genes associados a doenças humanas, bem como seu padrão de expressão, já são conhecidos ou estão sendo estudados nesse teleósteo. Genes ortólogos envolvidos em patologias neurológicas, como Parkinson, Alzheimer e Huntington já foram identificados (Sager et al., 2010). Além disso, foram desenvolvidos modelos transgênicos expressando genes humanos mutados e modelos *knockout* que reproduzem patologias humanas, bem como técnicas para controle da expressão gênica (Bandmann & Burton, 2010).

Recentemente, o peixe-zebra também foi considerado um importante modelo para estudos neurológicos e comportamentais (Egan et al., 2009; Piato et al., 2011; Ghisleni et al., 2011; Stewart et al., 2010). O sistema nervoso central (SNC) do peixe-zebra apresenta uma complexidade organizacional com células neuronais especializadas, células gliais e circuitos neuronais semelhantes aos observados em mamíferos (Sager et al., 2010). A ocorrência dos principais neurotransmissores encontrados em mamíferos, incluindo aminoácidos (glutamato, GABA, glicina), monoaminas (histamina, dopamina, norepinefrina, epinefrina, serotonina, melatonina) e acetilcolina (ACh), entre outros, bem como seus mecanismos de ação já foram descritos em peixe-zebra (Rinkwitz et al., 2011). Esse teleósteo apresenta os sistemas motor,

sensitivo e endócrino bem desenvolvido, alta sensibilidade a alterações ambientais e manipulações farmacológicas e um amplo espectro de fenótipos comportamentais conhecidos (Egan et al., 2009; Cachat et al., 2010; Sager et al., 2010; Burne et al., 2011). Agentes farmacológicos que interferem na transmissão sináptica e na estabilidade da membrana neuronal mostraram, em peixe-zebra, efeitos semelhantes aos verificados em humanos, sugerindo a existência de mecanismos de controle neurológico semelhante (Lieschke & Currie, 2007).

A grande maioria dos peixes teleósteos adultos, como o peixe-zebra, são amonotélicos (produzem amônia como produto da excreção nitrogenada), e através dos transportadores chamados proteínas rhesus (Rh) conseguem excretar seus produtos tóxicos do catabolismo dos aminoácidos. Entretanto, algumas espécies de peixes teleósteos durante o desenvolvimento expressam transportadores de uréia (TU) que possuem um papel vital durante o desenvolvimento, sendo considerados neste período ureotélicos (produzem uréia como produto da excreção nitrogenada) (Wright et al., 1995; Chadwick & Wright, 1999; Barimo et al., 2004; Essex-Fraser et al., 2005). As altas taxas de excreção de uréia durante a fase inicial do desenvolvimento em teleósteos, como o peixe-zebra são devidas a funcionalidade do ciclo uréia/ornitina, que é necessário enquanto a excreção da amônia é limitada pelas brânquias que ainda estão em desenvolvimento nos embriões (Rombough, 2002). A excreção de amônia é limitada devido à falta de transportadores de amônia até o 3 dpf, onde ocorre um aumento da expressão das proteínas Rh, aumentando a taxa de excreção desse metabólito (Braun et al., 2009).

Recentemente, estudos avaliando características comportamentais do peixe-zebra foram desenvolvidos, envolvendo a análise da atividade locomotora, agressividade, interação social e memória e aprendizado (Guo, 2004; Gerlai et al., 2006; 2009; Blank et al., 2009; Wong et al. 2010).



O comportamento locomotor desempenha um papel crucial na alimentação, defesa e atividade social do peixe-zebra ao longo da vida. O desenvolvimento normal da atividade locomotora ocorre durante a embriogênese (Granato et al., 1996), a partir de 18 horas-pós-fertilização (dpf) iniciam as contrações musculares espontâneas e em 48 hpf as larvas já desempenham respostas de fuga (Granato et al., 2006). Alguns estudos já demonstraram que drogas como etanol, anfetamina e cocaína causam um efeito hiperlocomotor em larvas de peixe-zebra (Iron et al., 2010; Chen et al., 2011). Em peixe-zebra adultos, drogas como MK-801 e cafeína são capazes de induzir um efeito hiperlocomotor em alguns parâmetros tais como, aumento na distância percorrida, velocidade média e número de cruzamentos (Seibt et al., 2010; Riehl et al., 2011; Maximino et al., 2011). Além disso, Savio e colaboradores (2011) demonstraram que o tratamento com prolina induz o aumento da atividade locomotora em peixe-zebra, sugerindo que esta espécie pode ser um modelo para estudos de erros inatos do metabolismo.

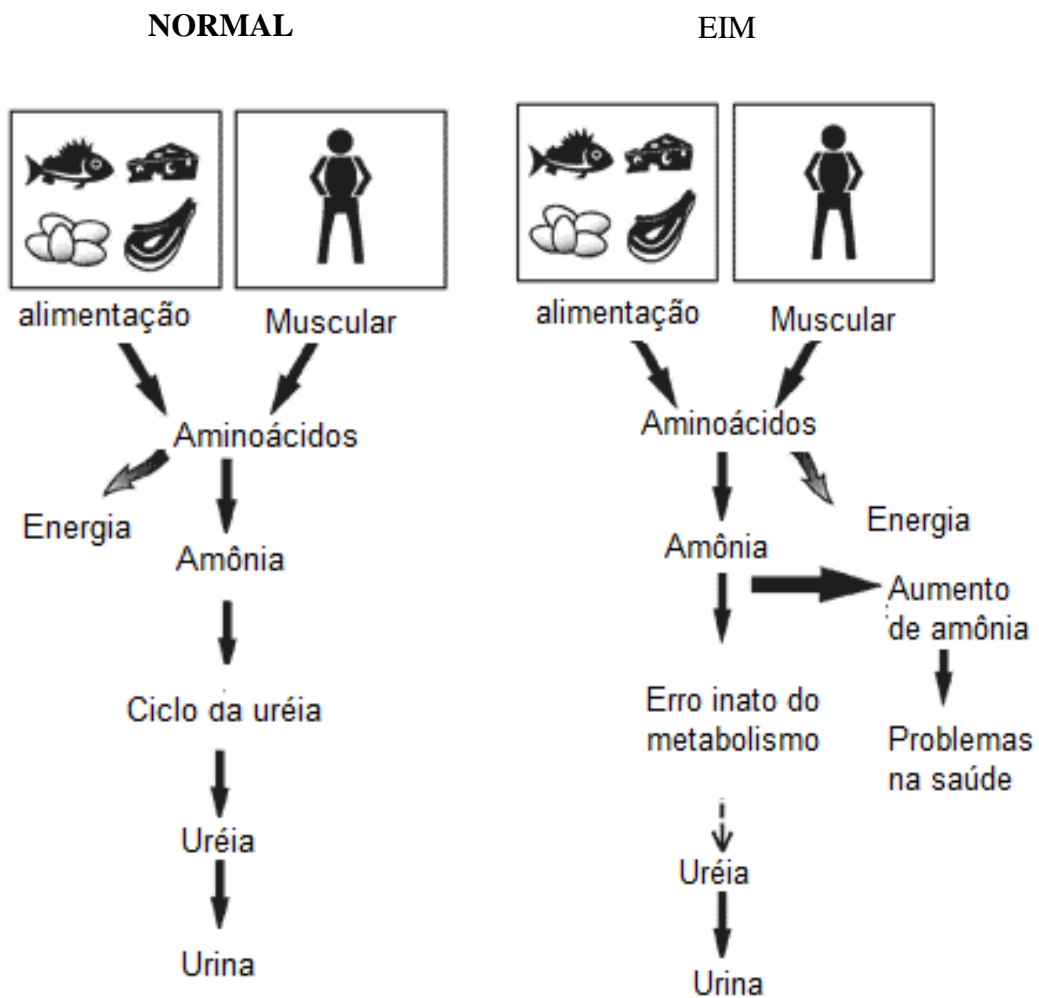
## **1.2 HIPERARGININEMIA**

Os erros inatos do metabolismo (EIM) são um grupo de doenças genéticas humanas causadas pela deficiência ou ausência de uma proteína, geralmente uma enzima. A maioria dos EIM ocorre em função de defeitos em genes específicos que codificam enzimas que facilitam a conversão de substratos em outros produtos. Na maioria das desordens, tais deficiências induzem ao acúmulo de substâncias que são tóxicas e interferem no funcionamento normal ou podem comprometer a síntese de compostos essenciais (Figura 3). Estas doenças são raras e sua manifestação pode ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento, inclusive na fase adulta (Childs & Valle, 2000; Sedel et al., 2007).

Com relação ao metabolismo de aminoácidos, diversas enzimas participam do processo de interconversão de aminoácidos e da remoção de nitrogênio. O grupamento amino dos aminoácidos dá origem à amônia, que deve ser excretada devido ao seu efeito tóxico, principalmente no SNC. O excesso de amônia é convertido em uréia através do ciclo da uréia, que ocorre principalmente no fígado, sendo esta transportada pela circulação sanguínea até os rins, onde é eliminada. O ciclo da uréia consiste em uma série de seis reações que são necessárias para a remoção do nitrogênio e produção de uréia (Brusilow & Horwich, 2001).

A hiperargininemia é um erro inato no ciclo da uréia, causado pela deficiência de arginase, enzima final do ciclo da uréia que converte a arginina em ornitina e uréia. Trata-se de uma doença autossômica recessiva, que resulta no acúmulo tecidual e plasmático de arginina e seus metabólitos, os compostos guanidínicos (Crombez & Cederbaum, 2005). A arginase existe em duas formas e possui uma ampla distribuição tecidual: a forma citosólica (AI) é altamente expressa no fígado e, a forma mitocondrial (AII) parece ser mais amplamente expressa, estando envolvida na biossíntese de poliaminas e dos aminoácidos ornitina, prolina e glutamato e em processos inflamatórios (Ash et al., 1998; Crombez & Cederbaum, 2005).

As manifestações clínicas desta doença diferem substancialmente das demais doenças metabólicas do ciclo da uréia. Entre elas, destaca-se o fato de que a ocorrência de hiperamonemia não é significativa na hiperargininemia. A hiperargininemia é caracterizada por sintomas neurológicos, comportamentais e morfológicos, como retardo mental e psicomotor, epilepsia, hiperatividade, irritabilidade e estatura baixa (Marescau et al., 1990; Brusilow & Horwich, 2001; Crombez & Cederbaum, 2005).



**Figura 3:** Representação ilustrativa das diferenças entre indivíduo que apresenta EIM dos aminoácidos e indivíduo normal. Esquema adaptado de [http://www.newbornscreening.info/Amino\\_acid/argininemia.html](http://www.newbornscreening.info/Amino_acid/argininemia.html)

### 1.3 SISTEMA PURINÉRGICO

#### 1.3.1 ATP

A existência da neurotransmissão purinérgica foi proposta pela primeira vez em 1972 por Geoffrey Burnstock. No sistema purinérgico (Figura 4), os nucleotídeos de adenina são empregados como neurotransmissores, sendo o ATP (adenosina 5'-trifosfato) e a adenosina as principais moléculas sinalizadoras (Burnstock, 1972). Receptores de membrana para

adenosina e ATP foram identificados em 1978 e denominados P1 e P2, respectivamente (Burnstock, 1978). O sistema purinérgico constitui uma rota comum de comunicação célula-célula, envolvida em muitos mecanismos neuronais e não neuronais como respostas imunes, inflamação, dor, proliferação e morte celular (Abbracchio et al., 2009; Burnstock & Knight, 2004). Os receptores purinérgicos encontram-se amplamente distribuídos por todo o SNC e sistema nervoso periférico (SNP) (Ralevic & Burnstock, 1998).

O ATP é sintetizado e armazenado em terminais pré-sinápticos e liberado na fenda sináptica sob estímulos nervosos, podendo ser coliberado juntamente com outros neurotransmissores, como acetilcolina, glutamato, noradrenalina, serotonina e ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) (Burnstock, 2004; North & Verkhatsky, 2006; Zimmermann, 2008). Uma vez liberado no meio extracelular, o ATP pode modular a sinalização purinérgica através da ativação de receptores do tipo P2 (Zimmermann, 2001; Robson et al., 2006). Os receptores do tipo P2 são divididos em dois grupos, P2X e P2Y, de acordo com seu mecanismo de ação, farmacologia e clonagem molecular (Ralevic & Burnstock, 1998; Skaper et al., 2010; Surprenant & North, 2009). O grupo P2X é composto por sete (P2X1-7) subtipos de receptores ionotrópicos com permeabilidade rápida e seletiva para cátions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ). Esses receptores encontram-se amplamente distribuídos em neurônios, células gliais e músculo liso e são ativados por ATP (Burnstock, 2004). O grupo P2Y consiste em oito subtipos de receptores metabotrópicos (P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> e P2Y<sub>14</sub>) que podem ser ativados por diversos nucleotídeos: ATP, ADP, UTP e UDP (Abbracchio et al., 2006; Burnstock, 2007; Erb et al., 2006). Os receptores P2Y estão presentes em vários tecidos e sistemas, como epitelial, muscular, cardíaco, nervoso e imunológico (Burnstock, 2006, 2007). No sistema nervoso, controlam canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$  e a liberação de outros neurotransmissores (Hussl & Boehm, 2006). Além de atuar em receptores

do tipo P2, o ATP liberado em resposta a uma atividade cerebral pode ser convertido em adenosina, através de sua hidrólise pelas ectonucleotidases (Zimmermann, 2001; Robson et al., 2006).

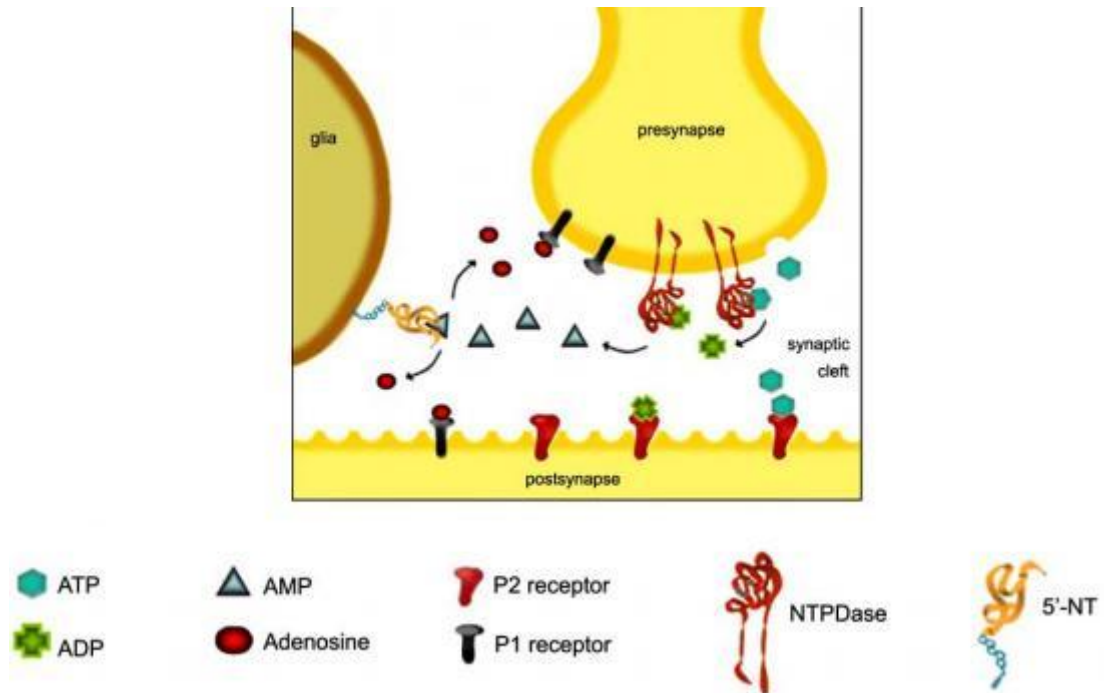
Os receptores P2 já foram clonados e identificados no peixe-zebra (Diaz-Hernandes et al., 2002; Kucenas et al., 2003; Appelbaum et al., 2007; Young, 2010). A família P2X possui nove membros, sendo destes seis ortólogos a genes dos receptores P2X de mamíferos, dois parálogos e um gene ainda precisa ser devidamente classificado (Kucenas et al., 2003; 2009). Os subtipos dos receptores P2X do peixe-zebra contêm resíduos altamente conservados, os quais são encontrados nas subunidades de mamíferos. Até o momento, foram identificadas oito proteínas funcionais na família de receptores P2Y (Ralevic & Bursntock, 1998), e somente os receptores P2Y<sub>1</sub> foram identificados em trombócitos de peixe-zebra (Gregory & Jagadeeswaran, 2002).

### **1.3.2 ADENOSINA**

A adenosina é um neuromodulador endógeno que está envolvido no controle de vários mecanismos do SNC (Boison, 2007). Essa purina não é armazenada em vesículas e não é liberada por exocitose como outros neurotransmissores (Fredholm, 2003). A adenosina pode ser produzida no meio intracelular e transportada para o meio extracelular através de transportadores específicos bidirecionais (que mantém os níveis intracelulares e extracelulares de adenosina em equilíbrio), pode ser formada a partir da hidrólise do ATP pela cascata enzimática das ectonucleotidases ou ainda a partir da degradação do AMP cíclico (AMPC) (Latini & Pedata, 2001; Antonioli et al., 2008).

A função neuromoduladora da adenosina é exercida através dos receptores purinérgicos do tipo P1 (Trincavelli et al., 2010), subdivididos em A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>. Esses

receptores encontram-se acoplados à proteína G e têm sete domínios transmembrana formados por aminoácidos hidrofóbicos (Abbracchio et al., 2009). Os receptores  $A_1$ , que apresentam alta afinidade pela adenosina, são amplamente distribuídos no encéfalo, principalmente no córtex, hipocampo, cerebelo e medula espinhal (Ribeiro et al., 2002). A ativação de receptores  $A_1$  pré-sinápticos diminui o funcionamento das sinapses excitatórias através da inibição da liberação de glutamato. Sua ativação pós-sináptica leva à estabilização do potencial de membrana através do controle do fluxo de  $Ca^{+2}$  e  $K^+$  (Boison, 2005; Fredholm et al., 2005). Os receptores  $A_2$  são subdivididos em  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$ , sendo que os receptores  $A_{2A}$  apresentam alta afinidade pela adenosina. A ativação dos purinoreceptores  $A_2$  pode estimular a adenilato ciclase, podendo levar ao aumento da produção de AMPc, aumento no influxo de  $Ca^{2+}$  e inibição dos canais de  $Na^+$  (Ribeiro et al., 2002). Os receptores  $A_{2A}$  estão localizados em altos níveis no bulbo olfatório e em neurônios gabaérgicos estriato-palidais e em menor nível em outras regiões cerebrais (Ribeiro et al., 2002). Embora em pequena densidade, os receptores  $A_{2B}$  são encontrados na maioria dos neurônios e células gliais (Etherington & Frenguelli, 2004; Fredholm et al., 2005). Os receptores do tipo  $A_3$ , de baixa afinidade pela adenosina, são expressos em neurônios e células gliais e distribuídos por todo o encéfalo, com menor densidade em relação aos outros receptores P1 (Fredholm et al., 2001; Hammarberg et al., 2003; Wittendorp et al., 2004) e estão claramente envolvidos em processos de injúria cerebral, como hipóxia e inflamação (Chen et al., 2006; Lee et al., 2006). Recentemente, foi demonstrada a presença de duas formas de receptores  $A_{2A}$  e uma forma de receptor  $A_{2B}$ , bem como a presença de receptor de adenosina  $A_1$  em cérebros de embriões de peixe-zebra (Boehmler et al., 2009).



**Figura 4:** Representação esquemática da sinalização purinérgica no sistema nervoso central. O ATP liberado liga-se a receptores P2 localizados em membranas pós-sinápticas, pré-sinápticas e glia. A degradação do ATP origina a adenosina, que atua em receptores P1. A sinalização glia-neurônio, também pode ser controlada pela adenosina. Figura obtida de Cognato & Bonan, 2010.

### 1.3.3 ECTONUCLEOTIDASES

Os nucleotídeos extracelulares podem atuar como moléculas sinalizadoras que precisam ter o seu sinal inativado após a sua ação. A inativação deste sinal e a manutenção das concentrações dos nucleotídeos pode se dar pela hidrólise extracelular dos mesmos. Os nucleotídeos são hidrolisados por uma cascata que resulta na formação do respectivo nucleosídeo e fosfato livre (Zimmermann, 2008; Schetinger et al., 2007). As enzimas que catalisam esta reação são as ectonucleotidasas. Essas enzimas estão ancoradas na membrana celular, possuindo seu sítio ativo voltado para o meio extracelular ou estão presentes na forma

solúvel no meio intersticial. Diversas famílias de enzimas constituem o grupo das ectonucleotidasas, constituído por quatro famílias de enzimas: Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases), Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPPs), fosfatases alcalinas e Ecto-5'-nucleotidasas (E-5'NT) (Robson et al., 2006; Zimmerman, 2001).

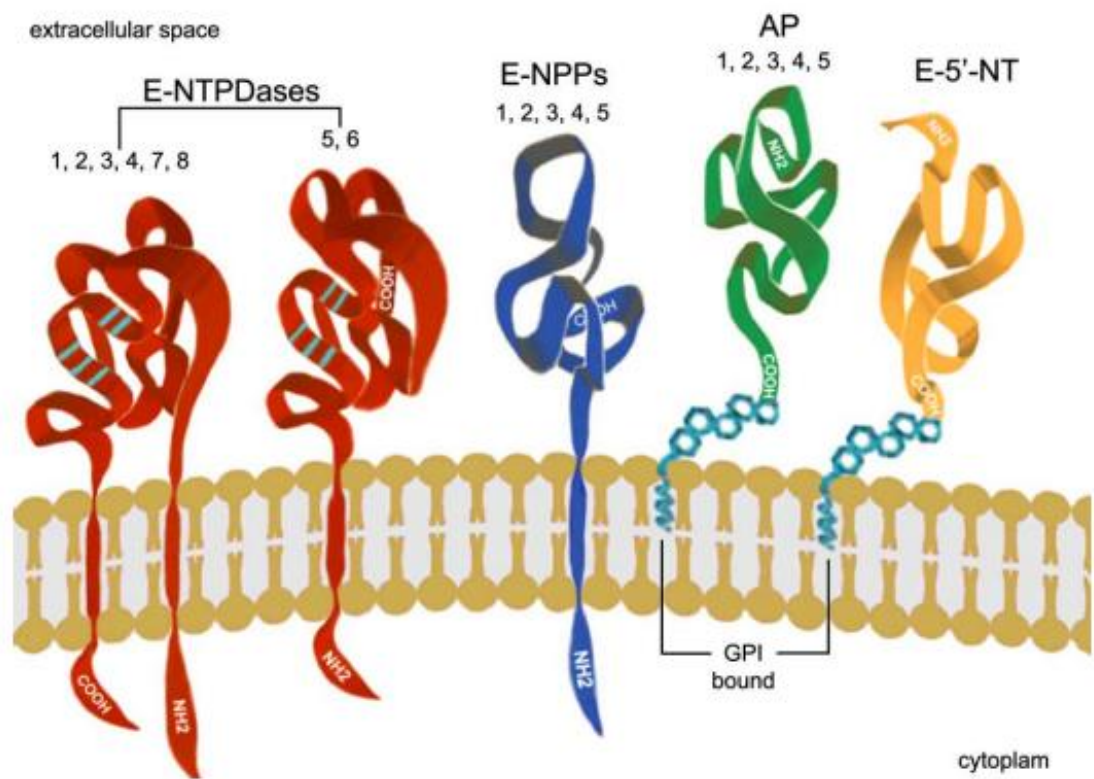
As E-NTPDases podem hidrolisar nucleosídeos 5'-trifosfatados e nucleosídeos 5'-difosfatados e apresentam membros em vertebrados, invertebrados, plantas, leveduras e protozoários (revisado em Zimmermann, 2001), os quais diferem em relação à preferência pelo substrato (Figure 5). Os membros da família das NTPDases são codificados por oito genes diferentes, chamados de genes *ENTP*. Dos oito membros descritos até o momento, quatro estão localizados na membrana celular com o sítio ativo voltado para o meio extracelular (NTPDases 1, 2, 3 e 8). As NTPDases 5 e 6 se localizam intracelularmente, porém são secretadas após expressão heteróloga. As NTPDases 4 e 7 apresentam localização intracelular com o sítio ativo voltado para o lúmen de organelas citoplasmáticas (Zimmermann, 2000; Robson et al., 2006). Em termos de hidrólise de nucleotídeos, a NTPDase1 hidrolisa ATP e ADP igualmente (Heine et al., 1999). A enzima NTPDase2 hidrolisa 30 vezes mais ATP do que o ADP. A NTPDase3 e a NTPDase8 preferem o ATP em relação ao ADP numa razão de hidrólise de aproximadamente 3:1 e 2:1, respectivamente (Chadwick et al., 1998; Bigonnesse et al., 2004). As NTPDases hidrolisam tanto ATP como ADP, formando AMP na presença de íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  (Robson et al., 2006).

As E-5'NT são uma família de enzimas que desfosforilam nucleosídeos monofosfatados não cíclicos (Bianchi & Spsychala, 2003), através da hidrólise da ligação fosfodiéster de 5'-ribonucleotídeos, levando à formação do correspondente ribonucleosídeo e fosfato. Essa enzima é ancorada à membrana plasmática por um glicosilfosfatidilinositol (GPI) e possui a forma estrutural de dímero com pontes dissulfeto entre as cadeias. O



ancoramento por GPI pode ser clivado pela ação de uma fosfolipase C específica, dando origem a formas solúveis desta enzima (Zimmermann, 2000; Hunsucker et al., 2005). A principal função em animais é a hidrólise de AMP até adenosina (Zimmermann, 2000). As Ecto-5'-NT apresentam uma ampla distribuição tecidual e fazem parte da cascata para finalizar a ação de nucleotídeos como ATP e moléculas sinalizadoras que agem em receptores P2X e P2Y, sendo a principal enzima responsável pela formação extracelular de adenosina (Zimmermann, 2000).

No peixe-zebra, estudos demonstraram a presença de uma NTPDase e uma Ecto-5'-NT em membranas cerebrais (Rico et al., 2003; Senger et al., 2004). Estas duas enzimas foram caracterizadas como cátion-dependentes, apresentando atividade máxima à temperatura de 37 °C, pH ótimo entre 7,2 e 8,0,  $K_M$  na faixa do micromolar e uma ampla especificidade por outros nucleotídeos (Rico et al., 2003; Senger et al., 2004). Estudos do nosso laboratório identificaram a presença de três isoformas diferentes de NTPDase 2 (*NTPDase2mv*, *NTPDase2mg*, *NTPDase2mq*) em encéfalo de peixe-zebra (Rico et al., 2006). A co-localização da NTPDases 1 e 2 já foi descrita em células de retina de peixe zebra (Ricatti et al., 2009) e a NTPDase 3 foi caracterizada em neurônios sensoriais desta espécie (Appelbaum et al., 2007). A hidrólise dos nucleotídeos em peixe-zebra adultos aumenta em função da concentração de proteína e a formação de produto mostra-se linear na taxa de 3-10 µg de proteína para cérebro e fígado e, de 3-5 µg de proteína para coração. O perfil da expressão gênica foi realizado, demonstrando a presença de diferentes níveis de transcritos das NTPDases em cérebro, coração e fígado desta espécie (Rosemberg et. al, 2010).



**Figura 5:** Representação esquemática da degradação extracelular dos nucleotídeos derivados de purinas. NTPDases e a 5'-nucleotidase são as enzimas que atuam na conversão de ATP a adenosina. Fosfatases alcalinas hidrolisam nucleotídeos monofosfatados e as NPPs atuam no catabolismo extracelular dos dinucleotídeos. Figura obtida de Cognato & Bonan, 2010.

#### 1.4 SISTEMA PURINÉRGICO E HIPERARGININEMIA

A hiperargininemia é uma doença rara entre os EIM, tipicamente presente em crianças entre 2 a 4 anos de idade, causando retardo no desenvolvimento associado com progressivos espasmos (Brusilow & Horwich, 2001; Scaglia et al., 2006). O efeito do acúmulo de arginina nas fases iniciais do desenvolvimento já foi demonstrado através da utilização de ratos que mimetizam a deficiência da enzima arginase de humanos (Iyer et al., 2002; Deignan et al., 2008). Por outro lado, outros estudos foram desenvolvidos a fim de avaliar os efeitos de altos

níveis de arginina sobre as enzimas envolvidas nas vias de sinalização do SNC (Reis et al., 2002; Delwing et al., 2005, 2007).

A sinalização purinérgica desempenha funções complexas como a neurotransmissão excitatória ou inibitória, além de atuar como fator trófico com efeitos em longo prazo de proliferação, crescimento e desenvolvimento celular (Abbracchio & Burnstock, 1998; Burnstock & Ulrich, 2011). Estudos demonstraram que a hidrólise extracelular de nucleotídeos é diminuída em soro de ratos submetidos à administração aguda de arginina (Delwing et al., 2005). Uma redução na hidrólise de nucleotídeos também foi observada quando a arginina foi administrada intracerebroventricularmente (Delwing et al., 2007). Entretanto, a administração intraperitoneal de arginina não foi capaz de alterar a atividade das ectonucleotidases em sinaptossomas de hipocampo de ratos (Delwing et al., 2007). Tais resultados sugerem que as enzimas envolvidas na modulação dos níveis de ATP e adenosina são alteradas pela disfunção cerebral causada pela hiperargininemia.

## **1.6. JUSTIFICATIVA**

Considerando que o peixe-zebra é um modelo importante para estudo de diversas doenças do metabolismo e que o sistema purinérgico está envolvido nos prejuízos relacionados aos EIM, o peixe-zebra torna-se um importante modelo para avaliação do acúmulo de aminoácidos e também para a caracterização desse efeito sobre as enzimas que fazem a modulação do sistema purinérgico. Além disso, o peixe-zebra pode ser um excelente modelo para o estudo de doenças raras que provocam acúmulo de aminoácidos, como a hiperargininemia, sem desenvolver outros prejuízos causados pelo hiperamonemia.

## **1.7 OBJETIVOS**

### **1.7.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar as atividades ectonucleotidásicas em um modelo agudo de hiperargininemia em peixe-zebra em diferentes estágios do desenvolvimento, assim como avaliar diferentes parâmetros comportamentais neste modelo.

### **1.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar a atividade *ex vivo* da hidrólise de ATP, ADP E AMP em membranas de cérebro de larvas e adultos de peixe-zebra submetidos ao modelo agudo de hiperargininemia;
- Determinar a expressão gênica das E-NTPDases e ecto-5'-nucleotidase em encéfalo de peixe-zebra larvas e adultos submetidos ao modelo agudo de hiperargininemia.
- Avaliar a o efeito da hiperargininemia na morfologia de larvas de peixe-zebra, bem como sobre parâmetros comportamentais, tais como atividade locomotora.

## **CAPÍTULO 2**

### **ARTIGO CIENTÍFICO**

Acute arginine exposure alters ectonucleotidase activities and morphology of zebrafish larvae

*(Danio rerio)*

Katiucia Marques Capiotti, Lidiane Fazenda, Luiza Reali Nazario, Fabiano Peres Menezes,  
Maurício Reis Bogo, Rosane Souza Da Silva, Angela Terezinha Wyse, Carla Denise Bonan

Artigo submetido para o periódico Zebrafish

☆ de [Ekker.Stephen@mayo.edu](mailto:Ekker.Stephen@mayo.edu) [ocultar detalhes](#) 5 jan (1 dia atrás)  
por [manuscriptcentral.com](http://manuscriptcentral.com)  
para [katucapiotti@gmail.com](mailto:katucapiotti@gmail.com)  
data 5 de janeiro de 2012 10:41  
assunto Zebrafish - Account Created in  
Manuscript Central  
enviado por [manuscriptcentral.com](http://manuscriptcentral.com)  
📌 Importante principalmente por  
causa das palavras na mensagem.

05-Jan-2012

Dear Dr. Capiotti:

A manuscript titled Acute arginine exposure alters ectonucleotidase activities and morphology of zebrafish larvae (*Danio rerio*) (ZEB-2012-0733) has been submitted by Dr. Carla Bonan to Zebrafish.

You are listed as a co-author for this manuscript. The online peer-review system, Manuscript Central, automatically creates a user account for you. Your USER ID and PASSWORD for your account is as follows:

Site URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/zebrafish>

USER ID: [katucapiotti@gmail.com](mailto:katucapiotti@gmail.com)

If you do not know your PASSWORD please go to [http://mc.manuscriptcentral.com/zebrafish?URL\\_MASK=b8PYRfsGtb3CX64jjs4K](http://mc.manuscriptcentral.com/zebrafish?URL_MASK=b8PYRfsGtb3CX64jjs4K). This link will take you to a page that will allow you to set a new account password.

You can use the above USER ID and PASSWORD to log in to the site and check the status of papers you have authored/co-authored.

Thank you for your participation.

**Title Page**

**Title:** Acute arginine exposure alters ectonucleotidase activities and morphology of zebrafish larvae (*Danio rerio*)

**Authors full name:**

Katiucia Marques Capiotti<sup>1,3</sup>; Lidiane Fazenda<sup>1,3</sup>; Luiza Reali Nazario<sup>1,3</sup>; Fabiano Peres Menezes<sup>1</sup>, Maurício Reis Bogo<sup>2,3</sup>; Rosane Souza Da Silva<sup>1,3</sup>; Angela Terezinha Wyse<sup>4</sup>; Carla Denise Bonan<sup>1,3,\*</sup>.

**Institutional Affiliations:**

<sup>1</sup> Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>4</sup> Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, CEP 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.

**Keywords:** Arginine, Development, Ectonucleotidases, Hyperargininemia, Larvae, Toxicity, Zebrafish.

**\*Contact details of the corresponding author**

Postal Address: Faculdade de Biociências, PUCRS.

Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone/ Fax: + 55 51 3353 4158/+ 55 51 3320 3612

e-mail: cbonan@pucrs.br

**Abstract**

Hyperargininemia is an inborn error of metabolism (IEM) characterized by tissue accumulation of arginine (Arg). Mental retardation and other neurological features are common symptoms in hyperargininemic patients. Considering purinergic signaling has a crucial role from the early stages of development and underlying mechanisms of this disease are poorly established, we investigated the effect of Arg administration on locomotor activity, morphological alterations, and extracellular nucleotide hydrolysis in in larvae and adult zebrafish. We showed that 0.1 mM Arg was unable to promote changes in locomotor activity. In addition, 7-day-post-fertilization (dpf) larvae treated with Arg demonstrated a decreased body size. Arg exposure (0.1 mM) promoted an increase in ATP, ADP, and AMP hydrolysis when compared to control group. These findings demonstrated that Arg might affect morphological parameters and ectonucleotidase activities in zebrafish larvae, suggesting that purinergic system is a target for neurotoxic effects induced by Arg.

**Keywords:** Arginine, Development, Ectonucleotidases, Hyperargininemia, Toxicity, Zebrafish.



## Introduction

ATP and adenosine play a crucial role from the early stages of development. Their levels are controlled by a complex cell surface-located group of enzymes called ectonucleotidases, such as nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family (NTPDase) and ecto-5'-nucleotidase.<sup>1,2</sup> The importance of the purinergic signaling throughout the development was demonstrated in several systems from amphibians, birds, and mammals, including humans.<sup>3</sup>

Extracellular ATP promotes increased permeability in the membrane of fertilized eggs through the activation of P2 receptors,<sup>4</sup> proving to be crucial in the fertilization process. Furthermore, during the complex phase of initial development, adenosine plays differential role from that observed in adults. This nucleoside regulates many physiological and pathophysiological processes through activation of G protein-coupled receptors called A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, and A<sub>3</sub>.<sup>5,6</sup> In addition, adenosine plays an important role during pre- and post- natal development. During prenatal life, adenosine is the dominant humoral regulator of embryonic brain and heart function.<sup>7</sup> In the forming central nervous system, activation of adenosine A<sub>1</sub> receptors potently inhibits the development of axons and can lead to leukomalacia.<sup>7</sup> Several studies have shown the involvement of adenosine and ectonucleotidase activities in inborn errors of metabolism (IEM), such as phenylketonuria,<sup>8</sup> Lesch-Nyhan disease,<sup>9</sup> hyperhomocysteinemia,<sup>10</sup> hyperprolinemia,<sup>11</sup> and hiperargininemia.<sup>12</sup> Hyperargininemia is a rare IEM, which affects the activity of the enzyme arginase, which is the final enzyme of urea cycle and catalyzes the conversion of arginine (Arg) to urea and ornithine.<sup>13</sup> Tissue accumulation of Arg is the biochemical hallmark of hyperargininemia. Patients affected by this disease show progressive dementia, epilepsy, ataxia, and spasticity, as well as cortical and pyramidal tract deterioration and memory impairment.<sup>14-16</sup> The hyperargininemia is typically

present in early childhood (between 2 and 4 years of age) with developmental delay associated with progressive spastic paraparesis.<sup>17, 18</sup>

Some studies have been concerned about the effect of Arg accumulation in early life through a mouse model that mimics human arginase deficiency and becomes a tool for studying potential treatments for hyperargininemia.<sup>14</sup> Other promising model for studying IEM is zebrafish, which is a small freshwater teleost which is widely used in Developmental Biology, Genetic, Behavioral, and Neurochemical studies.<sup>19-21</sup> In addition, the genome of this species is well-characterized and shares many similarities with the human genome.<sup>22</sup> In addition, several neurotransmitter systems have been already described in this species,<sup>23</sup> such as the purinergic system. P2 purinoceptors have been identified<sup>24</sup> and has been characterized the presence of NTPDases and ecto-5'-nucleotidase in zebrafish brain membranes.<sup>25-27</sup>

Considering that ATP and adenosine are important signaling molecules involved in several pathological conditions observed in hyperargininemic patients, such as epilepsy, cognitive deficit, and motor disorders, and zebrafish might be an important model for studying morphological and developmental aspects related to IEM, we evaluated the influence of arginine treatment on morphological and behavioral parameters in larvae and adult zebrafish.

## **Material and Methods**

### *Zebrafish embryos and larvae*

Zebrafish embryos were obtained from natural mating of adult zebrafish (wild type) breeds and maintained in an automated re-circulating tank system. After the posture, eggs were collected and kept in an incubator at 28.5°C on 14:10 light/dark cycle until 7 days post-fertilization (dpf) and used for subsequent experiments.

### *Adult zebrafish*

Zebrafish (*Danio rerio*) adult “wild type” (3 – 5 cm) of both sexes were obtained from a commercial supplier (Red Fish, Porto Alegre, Brazil) and were acclimated for at least 14 days in the experimental room. Animals were housed in groups of 20 fish in 15-L thermostated ( $26 \pm 2$  °C) tanks kept under constant chemical and mechanical water filtration and aeration (7.20 mg O<sub>2</sub>/L). Fish were maintained under a 14-10 h day/night photoperiod cycle and fed three times a day with commercial flakes (TetraMin®, NC, USA) and supplemented with live brine shrimp. All protocols were approved by the Institutional Animal Care Committee (10/00188–CEUA PUCRS) and followed Brazilian legislation, the guidelines of the Brazilian Collegiums of Animal Experimentation (COBEA), and the Canadian Council for Animal Care (CCAC) “Guide on the Care and Use of Fish in Research, Teaching, and Testing”.

### *Chemicals*

L-arginine, Trizma Base, EDTA, EGTA, sodium citrate, Coomassie blue, bovine serum albumin, malachite green, ammonium molybdate, polyvinyl alcohol, nucleotides, calcium, and magnesium chloride were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other reagents used were from analytical grade.

### *In vivo treatments*

#### *Arg treatment in zebrafish larvae*

A pilot experiment was conducted to choose the Arg concentrations for larval exposure. In this experiment, fertilized eggs were treated with 0.1, 1.0, and 1.5 mM Arg in order to use Arg concentration able to induce similar effects those found in hyperarginemic patients. Relative mortality rate, hatching, and larvae morphology were monitored. Arg-

treated animals started their treatment from 3 up to 7 dpf in 400 mL-tanks (pool of 100 larvae per tank). Arg was diluted in the same living water of control embryos. We observed a very pronounced mortality in zebrafish larvae treated with 1.0 and 1.5 mM Arg. Thus, for subsequent experiments, fertilized eggs were collected and treated with 0.1 mM Arg from 3 to 7 dpf or kept in living water (water from reverse osmosis plus marine salt) as control animals. The medium containing 0.1mM Arg was changed once a day during the treatment period, in order to maintain the Arg concentration. The behavioral, morphological, and biochemical experiments were performed at the 7 dpf.

#### Arg treatment in adult zebrafish

Groups of five adult animals were maintained in 5-L aquariums containing different Arg concentrations (0.1, 1.0, and 1.5 mM) during 1h.<sup>1</sup> Control group animals were maintained in in 5-L aquariums with tank water for the same period and conditions as the Arg-treated groups. The behavioral and biochemical experiments were performed immediately after the 1h-treatment with Arg.

#### *Behavioural parameters*

##### Zebrafish larval locomotor activity

All tests were performed with 7 dpf-larvae in the 96-well plate. After the Arg treatment and single larvae was placed in fresh 10% Hanks solution and transferred to 96-well plate. Larvae were housed individually for ease of tracking and statistical analysis. Temperature in the testing room was kept at 26 °C. The behavioral parameters analyzed were distance traveled, mean speed, and absolute turn angle.

### Zebrafish adult locomotor activity

Immediately after Arg treatment (0.1, 1.0, and 1.5 mM), control and treated animals were carefully placed individually into the novel tank, representing a 1.5 L rectangular tank (30 cm length × 15 cm height × 10 cm width) as previously described.<sup>28</sup> The behavioral test was performed during the same time frame each day (between 10:00 am and 4:00 pm). Animals were first habituated to the apparatus for 30 s and then behavioral activity was recorded over a period of 5 min. The testing tank was virtually divided into one horizontal and four equally vertical areas in order to evaluate the exploratory activity. All videos were recording with a digital webcam (Quick cam Pro 9000, LOGITECH) and movement of each larva was monitored by ANY-Maze recording software (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA).

### *Morphological evaluation*

Morphological evaluation was performed in larvae from 7 dpf under stereomicroscopy to search for body defects. Measure of body length was performed by photographic registration followed by measurement by an image analysis program Image J 1.37 for Windows. The body length was assumed as the distance of the center of an eye to tail bud.

### *Preparation of Zebrafish Brain Membranes*

Zebrafish Larvae were cryoanesthetized, euthanized by decapitation and eyes and tails were removed, and the brain-enriched portion of the larvae was dissected (pool of eighty larvae for each sample). Immediately after Arg treatment, adult zebrafish were euthanized and their whole brains (five brains for each sample) were dissected. Brains of adult zebrafish and larvae were homogenized in 60 vol. (v/w) of chilled Tris– citrate buffer (50 mM Tris–citrate, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, and pH 7.4 adjusted with citric acid) for NTPDase and ecto-5'-

nucleotidase assays.<sup>25,26</sup> Briefly, brain homogenates were centrifuged at  $800 \times g$  for 10 min and the supernatant fraction was subsequently centrifuged for 25 min at  $40\,000 \times g$ . The pellet of membrane preparations was frozen in liquid nitrogen, thawed, and resuspended in buffer. This freeze–thaw–wash procedure was used to ensure the lyses of brain vesicles membranes. For zebrafish larvae membranes, this was the last step to obtain the brain membrane. For adult zebrafish membranes, after lyses procedure, an additional centrifugation at  $40\,000 \times g$  for 20 min was performed. The final pellet was resuspended and used for biochemical analyses. All cellular fractions were maintained at 2–4°C throughout preparation and immediately used for enzyme assays.

#### *Protein determination*

Protein concentration was measured by the Coomassie blue method along, with bovine serum albumin as a protein standard.<sup>29</sup>

#### *Determination of ectonucleotidase activity*

The ectonucleotidase activities were determined as previously described.<sup>25,26</sup> Zebrafish larvae and adult brain membranes (3–5  $\mu g$  protein) were added to the reaction mixture containing 50 mM Tris–HCl (pH 8.0) and 5 mM  $CaCl_2$  (for NTPDase activities) or 50 mM Tris–HCl (pH 7.2) and 5 mM  $MgCl_2$  (for ecto-5'-nucleotidase activity) in a final volume of 200  $\mu L$ . Samples were preincubated for 10 min at 37°C before starting the reaction with the addition of substrate (ATP, ADP or AMP) to a final concentration of 1 mM. The reaction was stopped after 30 min with the addition of 200  $\mu L$  of trichloroacetic acid at a final concentration of 5%. The samples were chilled on ice for 10 min and 1 ml of a colorimetric reagent composed of 2.3% polyvinyl alcohol, 5.7% ammonium molybdate, and 0.08% malachite green was added in order to determine the inorganic phosphate released (Pi).<sup>30</sup> The

quantification of Pi released was determined spectrophotometrically at 630 nm and the specific activity was expressed as nmol of Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> of protein. In order to correct non-enzymatic hydrolysis of the substrates, controls with the addition of the enzyme preparation after the addition of trichloroacetic acid were used. All enzyme assays were performed in at least five different experiments, each one performed in triplicate.

#### *Semiquantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)*

After treatment, zebrafish larvae were collected (pool of thirty for each sample) and frozen for aftermost total RNA extraction. Adult zebrafish were euthanized and the brain removed by dissection (pool of five brains for each sample) under sterile conditions and also subjected to a total RNA extraction. Total RNA extraction was performed by TRIzol reagent (Invitrogen, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. The purity of the RNA was spectrophotometrically quantified by calculating the ratio between absorbance values at 260 and 280 nm. All samples were adjusted to 160 ng/μl and cDNA species were synthesized with SuperScript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, USA) following supplier's instructions. β-actin-PCR was performed as a cDNA synthesis control. PCR reactions were performed (total volume of 25 μl) using a concentration of 0.4 μM of each primer indicated below and 1 U platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA) in the supplied reaction buffer. The zebrafish sequence encoding to ectonucleotidases retrieved from the GenBank database *entpd1* (AAH78240), *entpd2\_mg* (XP\_697600), *entpd2\_mq* (XP\_687722), *entpd2\_mv* (AAH78419), *entpdase3* (ABR15509), *ecto-5'-nucleotidase* (NP\_957226), *β-actin* (AAC13314), and used for searching specific primers, which were designed using Oligos 9.6 program. In order to confirm the specificity of primers, each primer was compared with zebrafish genome and was able to recognize only its specific target sequence.

The following conditions were used for PCR reactions: 1 minute at 94 °C, 1 minute at the annealing temperature (see Table 1), 1 minute at 72 °C for 30 cycles for *entpd3* and for  $\beta$ -*actin*, *entpd1*, *entpd2\_mg*, *entpd2\_mq*, *entpd2\_mv*, *entpd3* and 5'-nucleotidase were used 35 cycles with a further post-extension cycle at 72 °C for 10 minutes. A negative control was included for each set of PCR reactions. PCR products were separated on a 1.0% agarose gel with GelRed 10 $\times$  and visualized with ultraviolet light. The fragment lengths expected for the PCR reactions were confirmed using Low DNA Mass Ladder and  $\beta$ -*actin* was determined as an internal standard. Band intensities were analyzed by optical densitometry using the software ImageJ 1.37 for Windows after running all PCR products in a single gel.

### *Statistical Analysis*

All assays were run in triplicate and expressed as means  $\pm$  S.E.M. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). *Post hoc* comparisons were made using Tukey's test considering  $P \leq 0.05$  as statistically different for biochemical experiments in adult zebrafish. For biochemical experiments, morphological aspects and locomotor activity of the zebrafish larvae, data were analyzed using Student *t*-tests. Statistical significance was considered when the *P* value was less than 0.05.

## **Results**

### *Morphological and behavioral parameters in zebrafish larvae*

First, we asked whether treatment with 0.1 mM Arg treatment could alter the morphology of zebrafish larvae during the development. Our results demonstrated that body length was decreased (4%) in larvae treated with Arg ( $t=3.936$ ,  $df=8$  and  $p<0.0478$ ;  $n=12$ ) in comparison with the control group (7dpf - Control:  $3.996 \pm 0.014$  mm; Arg:  $3.846 \pm 0.035$



mm; n=12) (Figure 1). We also investigate if this morphological change could affect the locomotor activity, since treatment with Arg also promoted malformation in zebrafish larvae (data not show). The evaluation of larval locomotor activity showed no differences in distance traveled ( $p=0.4238$ ;  $n=12$ ), medium speed ( $p=0.3836$ ;  $n=12$ ), and absolute turn angle ( $p=0.2995$ ) between control and Arg groups (Figure 2).

#### *Nucleotide hydrolysis in zebrafish larvae*

We evaluate the influence of Arg on NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities, which are involved in the control of nucleotide and nucleoside levels in larval zebrafish brain. The figures 3A-C show that zebrafish larvae exposed to 0.1 mM Arg treatment significantly increased the ATP (25%) ( $t=2.310$ ,  $df=10$ ,  $p<0.0435$ ,  $n=6$ ), ADP (32%) ( $t=2.480$ ,  $df=6$ ,  $p<0.0478$ ,  $n=6$ ), and AMP (55%) ( $t=3.167$ ,  $df=10$ ,  $p<0.0100$ ,  $n=6$ ) hydrolysis when compared to control groups. To evaluate whether the exposure of Arg in larvae could alter the relative gene expression of nucleotidases, RT-PCR analyses were performed when kinetic alterations were observed. The results demonstrated that the *entpd1* mRNA transcript levels were increased after 0.1 mM Arg treatment (17%;  $t=3.516$ ,  $df=5$  and  $p=0.0170$ ;  $n=5$ ) when compared to control, whereas *entpd2\_mg*, *entpd2\_mq*, *entpd2\_mv*, *entpd3* and ecto-5'-nucleotidase levels were not altered in all groups analyzed (Figure 4A and B).

#### *Nucleotide hydrolysis in zebrafish adults*

After verifying that Arg treatment modifies morphological, biochemical, and molecular parameters in zebrafish larvae, we observed whether acute treatment was able to induce changes on locomotion and ectonucleotidase activities in adult zebrafish. Our results demonstrate that the exposure to different Arg concentrations (0.1, 1.0, and 1.5 mM) were unable to induce changes on locomotor activity (data not shown). In addition, adult zebrafish

exposed to the same Arg concentration mentioned above did not alter ATP [F (3,20)= 0.219; p=0.8817; n=6], ADP [F (3,20)= 1.096; p=0.3739;n=6], and AMP [F (3,19)= 0,118; p=0.9483; n=6] hydrolysis when compared to control group (data not shown).

## Discussion

In the present study, we have shown that Arg can alter *in vivo* ectonucleotidase activities in brain zebrafish larvae. Arg treatment activated ATP, ADP, and AMP hydrolysis in larval zebrafish brain and decreased the body size of 7 dpf-larvae. Furthermore, the analysis molecular demonstrated that *entpd1* mRNA levels were increased in zebrafish brain larvae. In contrast, changes were not observed in ATP, ADP, and AMP hydrolysis after acute *in vivo* exposure to Arg in adults.

The hyperargininemia is an illness related to the absence or deficiency of the arginase enzyme, resulting in accumulation of high levels of Arg. Some studies have shown that arginase is very important in providing ornithine as a precursor to the synthesis of polyamines, which are involved in the control of DNA, RNA, and protein synthesis during cell growth, differentiation, and development<sup>31-33</sup> and are important in embryonic development<sup>34</sup>.

Some studies reported that hyperargininemic patients have as their primary symptom delayed development associated with progressive spastic paraparesis.<sup>18,35</sup> The Arg doses chosen in this study are consistent with those levels achieved in plasma and cerebrum of hyperarginemic patients which ranges around of 1.3 mM and 0.3 nmol/Kg, respectively.<sup>15</sup> The present results showed that there was a decrease in body size of zebrafish larvae (7 dpf) treated with Arg and these data are in agreement with those reported in literature, which demonstrated that children with hyperargininemia have development delay.<sup>17,18</sup> Studies showed that treatment with Arg was able to decrease motor function of rats.<sup>14</sup> In contrast, our

data demonstrated that there were no changes in locomotor activity in zebrafish larvae. These findings indicate that Arg could induce different effects depending on the route of administration, animal model used in the study, and stage of development in which the treatment was administered.

The purinergic signaling plays complex roles such as inhibitory or excitatory neurotransmission, besides acting as a trophic factor in long-term effects on cell proliferation, growth and development.<sup>3,36</sup> The purinergic signaling was altered in rats submitted to hyperargininemia. Studies demonstrated that extracellular nucleotide hydrolysis is decreased in serum of rats subjected to acute administration of Arg.<sup>12</sup> However, intraperitoneal administration of Arg did not alter the ectonucleotidase activities in the hippocampus synaptosomes.<sup>11</sup> A decrease was observed in the nucleotide hydrolysis when the arginine was administered intracerebroventricularly.<sup>11</sup> Action of these NTPDases may regulate the concentrations of ATP, ADP, and AMP by increasing/decreasing their hydrolysis with a consequent increase/decrease in adenosine levels, a natural protective metabolite.<sup>37</sup> Our results demonstrated that there was an increase of ATP, ADP, and AMP hydrolysis in membrane-enriched fraction from larval zebrafish brain. These data suggest that the Arg treatment could alter adenosine levels in larval zebrafish brain.

The alterations promoted by Arg on ectonucleotidase activities could be a consequence of transcriptional control. Interestingly, the results demonstrated that the *entpd1* relative expression levels were significantly increased after treatment with Arg. Therefore, the increase of ATP and ADP hydrolysis in zebrafish larvae induced by Arg treatment is probably related to a higher *entpd1* gene expression. NTPDase 1 hydrolyzes both nucleotides ATP and ADP in a similar ratio<sup>38,39</sup> and both activities ATPase and ADPase are increased in early stages of development with a gradual decrease throughout development,<sup>40</sup> suggesting that NTPDase1 might play an important role in control of nucleotide levels in brain development.

However, we observed an increase in AMP hydrolysis whereas ecto-5'-nucleotidase gene expression levels were not altered, suggesting that this enzyme activity could be regulated by post-translational events.

We questioned if the purinergic system also is affected in adults treated with Arg acutely, since these rare diseases and their manifestations can occur at any stage of development even in adulthood.<sup>40,41</sup> Our data demonstrated that acute treatment with Arg did not alter the ectonucleotidase activities in adult zebrafish brain, suggesting that a short-term Arg exposure is not able to induce neurotoxic effects on SNC. Therefore, we suggested that this modulatory effect on purinergic signaling may be related with a critical period of development in which the brain reestablishes compensatory mechanisms in order to achieve homeostasis in adulthood.

In conclusion, the present study demonstrated that Arg treatment significantly increased ATP, ADP, and AMP hydrolysis, as well decreased the body size of 7 dpf zebrafish larvae. Considering acute treatment did not alter any parameters tested in adult zebrafish, it is possible to suggest that Arg is able to disrupt the tough control of brain development, likely in a way that includes nucleotide and nucleoside actions. Such findings reinforce the idea that zebrafish serves as a good model for studies of EIM, since it permits *extra utero* development evaluation and these diseases seem to be well connected with the early stages of development.

### **Disclosure Statement**

No competing financial interests exist.

## Acknowledgments

This work was supported by DECIT/SCTIE-MS through Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (Proc. 10/0036-5, conv. n. 700545/2008 – PRONEX). K.M.C is recipient of CNPq fellowship (Proc. no. 550992/2010-3) and C.D.B. was also recipient of Research scholarship from CNPq (Proc 301853/2010-0).

## References

1. Schetinger MR, Morsch VM, Bonan CD, Wyse AT. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors*.2007; 31:77-98.
2. Zimmermann H. ATP and acetylcholine: equal brethren. *Neurochem Int*.2008; 52: 634-48.
- 3 Burnstock G, Ulrich H. Purinergic signaling in embryonic and stem cell development. *Cell Mol Life Sci*. 2011; 68:1369- 94.
4. Kupitz Y, Atlas D. A putative ATP-activated Na<sup>+</sup> channel involved in sperm-induced fertilization. *Science*. 1993; 23: 484-6.
5. Fredholm BB. Adenosine receptors as targets for drug development. *Drug News Perspect*.2003; 261:283-9.
6. Ribeiro JA, Sebastiao AM, de Mendonca A. Participation of adenosine receptors in neuroprotection. *Drug News Perspect*. 2003; 16:80-6.
7. Rivkees SA, Zhao Z, Porter G, Turner C. Influences of adenosine on the fetus and newborn. *Mol Genet Metab*.2001; 74:160-71.
8. Wyse AT, Sarkis JJ, Cunha-Filho JS, Teixeira MV, Schetinger MR, Wajner M, et al. Effect of phenylalanine and its metabolites on ATP diphosphohydrolase activity in synaptosomes from rat cerebral cortex. *Neurochem Res*.1994; 19:1175-80.

9. Bertelli M, Cecchin S, Lapucci C, Jacomelli G, Jinnah HA, Pandolfo M, et al. Study of the adenosinergic system in the brain of HPRT knockout mouse (Lesch-Nyhan disease). *Clin Chim Acta*. 2006; 373:104-7.
10. Tasatargil A, Sadan G, Karasu E, Ozdem S. Changes in atrium and thoracic aorta reactivity to adenosinergic and adrenergic agonists in experimental hyperhomocysteinemia. *J. cardiovasc Pharmacol*. 2006; 47:673-9.
11. Delwing D, Delwing D, Sarkis JJ, Wyse AT. Proline induces alterations on nucleotide hydrolysis in synaptosomes from cerebral cortex of rats. *Brain Res*. 2007;32:210-5.
12. Delwing D, Gonçalves MC, Sarkis JJ, Wyse TS. L-NAME administration prevents the inhibition of nucleotide hydrolysis by rat blood serum subjected to hiperargininemia. *mino Acids*. 2005;29:267-72.
13. Ash DE. Structure and function of arginases. *J Nutr*. 2004;134:2765-67.
14. Iyer RK, Yoo PK, Kern RM, Rozengurt N, Tsoa R, O'Brien WE, et al. Mouse model for human arginase deficiency. *Mol Cell Biol*. 2002;22:4491-8.
15. Buchmann I, Milakofsky L, Harris N, Hofford JM, Vogel WH. Effect of arginine administration on plasma and brain levels of arginine and various related amino compounds in the rat. *Pharmacology* 1996;53:133–142.
16. Reis EA, de Oliveira LS, Lamers ML, Netto CA, Wyse AT. Arginine administration inhibits hippocampal  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. *Brain Research*. 2002;951:151–7.
17. Brusilow SW, Horwich A. Urea cycle enzymes. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed. McGraw-Hill, Inc, New York: E-Publishing Inc;2001, p.1909–1963.

18. Scaglia F, Lee B. Clinical, biochemical, and molecular spectrum of hyperargininemia due to arginase I deficiency. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.*2006;142C:113-20.
19. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet.*2007;8:353-67.
20. Gerlai R, Chatterjee D, Pereira T, Sawashima T, Krishnannair R. Acute and chronic alcohol dose: population differences in behavior and neurochemistry of zebrafish. *Genes Brain Behav.*2009;8:586-99.
21. Grossman L, Utterback E, Stewart A, Gaikwad S, Chung KM, Suciuc C, et al.. Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. *Behav Brain Res.* 2010; 214:277-84.
22. Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, et al.The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* 2000;10:1351-8.
23. Rico EP, Rosemberg DB, Seibt KJ, Capiotti KM, Da Silva RS, Bonan CD. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicol Teratol.* 2011; 33:608-17.
24. Kucenas S, Li Z, Cox JA, Egan TM, Voigt MM. Molecular characterization of the zebrafish P2X receptor *subunit gene* family. *Neuroscience.* 2003;121:935-45.
25. Rico EP, Senger MR, Fauth Mda G, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci.* 2003;73:2071-82.
26. Senger MR, Rico EP, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Ecto-5'-nucleotidase activity in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*2004;139:203-7.
27. Rosemberg DB, Rico EP, Langoni AS, Spinelli JT, Pereira TC, Dias RD, et al.. NTPDase family in zebrafish: Nucleotide hydrolysis, molecular identification and gene expression

- profiles in brain, liver and heart. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*2010;155:230-40.
28. Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A. Drinks like a fish: Zebrafish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000;67(4):773-82.
29. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
30. Chan KM, Delfert D, Junger JD. Direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup>-stimulated ATPase activity. *Anal Biochem.*1986;2:375–80.
31. Fozard JR, Prakash NJ, Grove J. Ovarian function in the rat following irreversible inhibition of L-ornithine decarboxylase. *Life Sci.*1980;27:2277-83.
32. Pegg AE, Seely JE, Pösö H, della Ragione F, Zagon IA. Polyamine biosynthesis and interconversion in rodent tissues. *Fed Proc.*1982;41:3065-72.
33. Hougaard DM. Polyamine cytochemistry: localization and possible functions of polyamines. *Int Rev Cytol.*1992;138:51-88.
34. Kusunoki S, Yasumasu I. Inhibitory effect of alpha-hydrazinoornithine on egg cleavage in sea urchin eggs. *Dev Biol.*1978;67:336-45.
35. Esquivel-Aguilar A, Castañeda-Hernández G, Martínez-Cruz A, Franco-Bourland RE, Madrazo I, Guízar-Sahagún G. Early administration of L-arginine in experimental acute spinal cord injury impairs long-term motor function recovery. *J Trauma.*2011; 70:1198-202.
36. Abbracchio MP, Burnstock G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol.* 1998;78:113-45.



37. Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*.2006;2:409–30.
38. Muller J, Rocha JBT, Battastini AMO, Sarkis JJF, Dias RD. Ontogeny of ATP and ADP hydrolysis by cerebral cortex synaptosomes from rats. *Braz J Med Biol Res*.1990;23:935-9.
39. Stanojević I, Bjelobaba I, Nedeljković N, Drakulić D, Petrović S, Stojiljković M, et al. Ontogenetic profile of ecto-5'-nucleotidase in rat brain synaptic plasma membranes. *Int J Dev Neurosci*.2011;29:397-403.
40. Childs B, Valle D. Genetics, biology and disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*.2000;1:1-19.
41. Sedel F, Barnerias C, Dubourg O, Desguerres I, Lyon-Caen O, Saudubray JM. Peripheral neuropathy and inborn errors of metabolism in adults. *J Inherit Metab Dis*.2007;30:642–53.

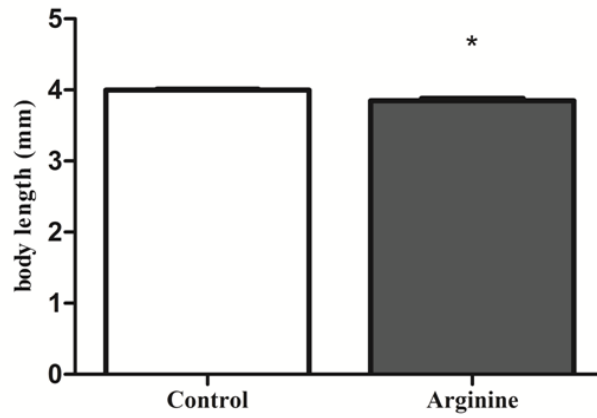
**LEGEND OF FIGURES**

Figure 1: Effect of exposure 0.1 mM Arg on morphological alterations in 7-dpf- zebrafish larvae. Morphology of body length was estimated using Image J 1.37 for Windows. Data is expressed as mean  $\pm$  S.E.M from 12 animals for each group and analyzed by Student's t test.  $*p < 0.05$  denotes a significant difference from control group.

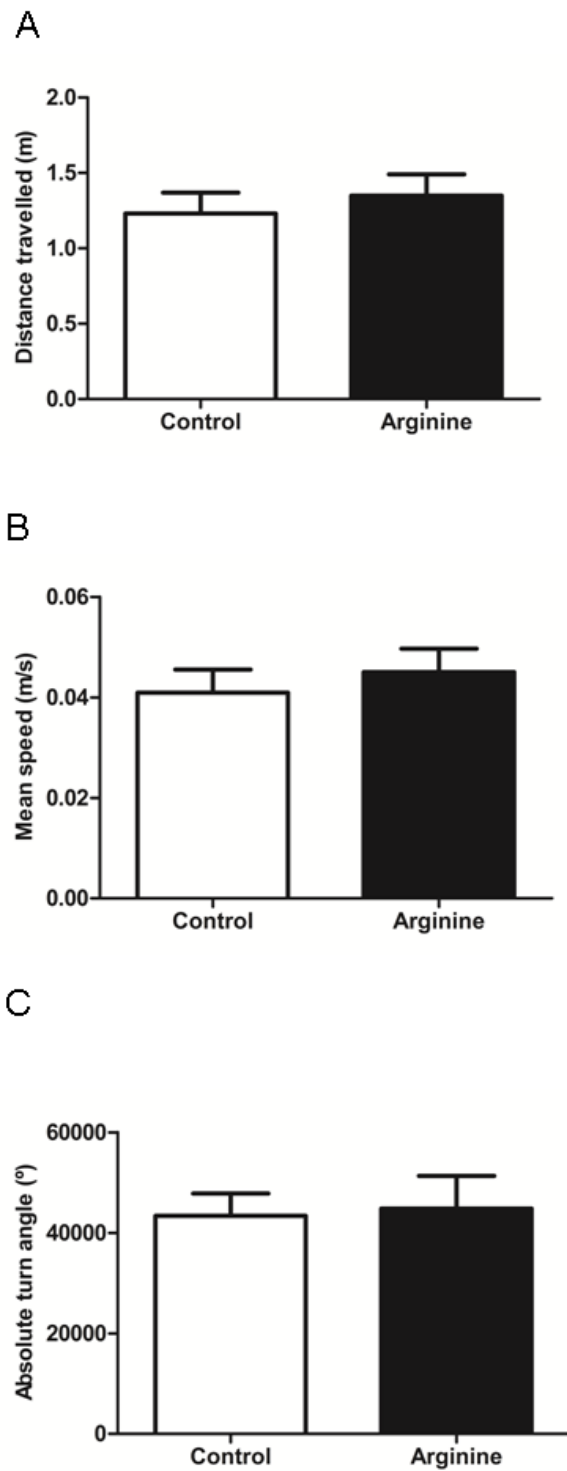


Figure 2: Effect of 0.1 mM Arg treatment on locomotor activity in 7-dpf- zebrafish larvae on distance traveled (A), mean speed (B) absolute turn angle (C) during 5 minutes of videorecording. Data were expressed as mean  $\pm$  S.E.M from 12 animals for each group and analyzed by Student's t test.

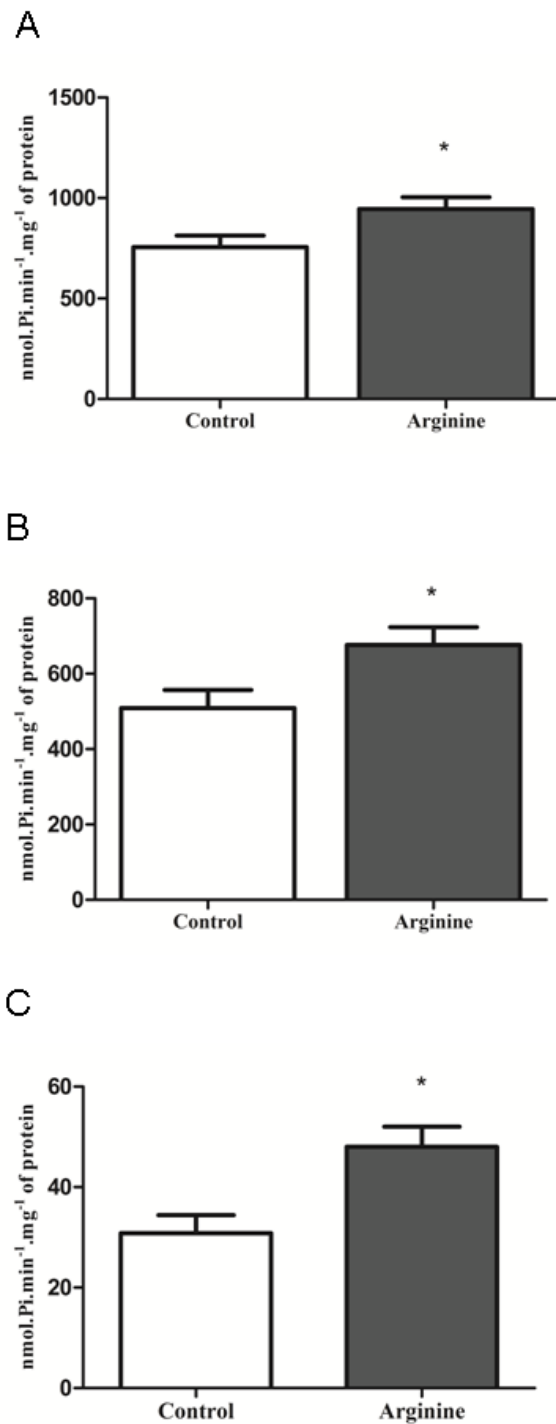


Figure 3: Effect of 0.1 mM Arg treatment on ATP (A), ADP (B), and AMP (C) hydrolysis in larval zebrafish brain membranes. Data were expressed as mean  $\pm$  S.E.M. from 6 animals for each group and were analyzed by Student's t test. \* $p < 0.05$  denotes a significant difference from control group.

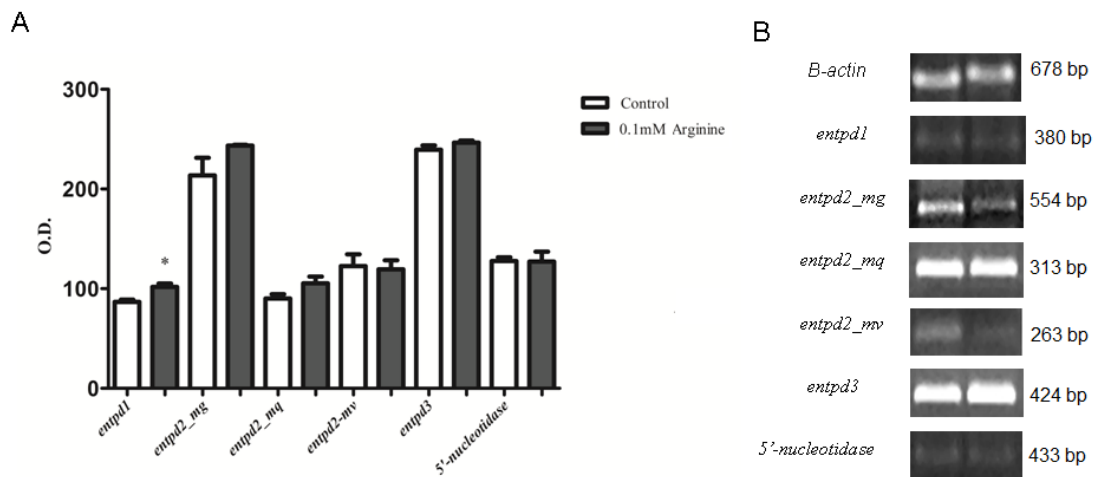


Figure 4: Effect of 0.1mM Arg treatment on ectonucleotidase transcripts in 7-dpf-zebrafish larvae. The figure shows  $\beta$ -actin, *entpd1*, *entpd2\_mv*, *entpd2\_mg*, *entpd2\_mq*, *entpd3* and *5'-nucleotidase* mRNA expression in zebrafish larvae. (A) Bars represent mean  $\pm$  S.E.M of optical density (n=5). (B) Representative gels of *entpds* and *5'-nucleotidase* mRNA expression from control and Arg-treated groups.

## **CAPÍTULO 3**

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

### 3.1 Considerações finais

A hiperargininemia é uma doença metabólica hereditária do ciclo da uréia, com transmissão autossômica recessiva, que ocorre devido à deficiência das enzimas arginase do tipo I (ARG1) (citosólica) expressa no fígado e arginase do tipo II (ARG2) (mitocondrial) envolvida na síntese de poliaminas e de aminoácidos, enzimas essas que catalisam a última reação deste ciclo convertendo o aminoácido arginina em uréia e ornitina. Esta doença caracteriza-se bioquimicamente por um aumento persistente da concentração sanguínea de arginina, com uma incidência de 1:36300 indivíduos (Rocha et al., 2009).

As enzimas arginases desenvolvem um papel além do ciclo da uréia, pois são importantes no fornecimento de ornitina e fornecem precursores da síntese de poliaminas que desempenham funções cruciais no controle do DNA, RNA, desenvolvimento e diferenciação celular e desenvolvimento (Fozaed et al., 1980; Pegg et al., 1982; Hougaard, 1992). Para que ocorra a excreção correta de amônia, é necessário que as arginases estejam expressas e funcionais. Em ratos adultos, os níveis de expressão das enzimas ARG1 e ARG2 variam de acordo com o órgão, sendo a ARG1 mais expressa no fígado, cérebro, intestino, rins, baço e pulmões e a ARG2 mais expressa em rins, pâncreas e cérebro, sugerindo que as isoformas das arginases podem desempenhar papéis específicos em cada órgão no ciclo da uréia (Choi et al., 2011). Yu e colaboradores (2002) demonstraram a expressão das arginases no desenvolvimento embrionário de camundongos, revelando que a ARG1 é altamente expressa no SNC, diferentemente da ARG2 que não foi encontrada nesse tecido, demonstrando que ARG2 não está relacionada com a deficiência induzida pela ARG1 na fase embrionária. Writy e colaboradores (2004) revelaram a presença de somente um dos genes da arginase em peixe-zebra adultos (ARG2), mas a presença de uma ARG1-like nos bancos de dados sugere a presença da ARG1 nessa espécie.

O peixe-zebra tem ganhado destaque no meio científico e demonstra grande potencial para estudos de EIM, uma vez que permite a absorção de diferentes aminoácidos envolvidos nestas patologias de maneira fácil, barata e eficiente (Savio et al., 2011; Wright, et al., 2004). Além disso, o peixe-zebra pode ser um ótimo modelo para avaliar características morfológicas, comportamentais e bioquímicas em diversas doenças relacionadas com os EIM, como a hiperargininemia, que ocorre principalmente nos estágios iniciais do desenvolvimento (crianças de 2 a 4 anos de idade) (Brusilow & Horwich et al., 2001) e pode levar a conseqüências dramáticas, como perda de memória, demência e epilepsia (Scaglia et al., 2006).

Os resultados apresentados no capítulo 2 tiveram como objetivo o desenvolvimento de um modelo de hiperargininemia em peixe-zebra. Considerando que o peixe-zebra é um animal ureotélico até o 3º dpf e que seus transportadores de amônia somente são expressos após a eclosão da larva, a exposição a arginina foi realizada em uma fase crucial do desenvolvimento dessa espécie, podendo assim mimetizar alguns dos sintomas encontrados em pacientes hiperargininêmicos.

Os resultados demonstram que o tratamento com arginina em larvas de peixe-zebra de até 7 dpf foi muito semelhante aos resultados encontrados em ratos (Scaglia & Lee, 2006), demonstrando uma diminuição do crescimento nas larvas. Além disso, nossos resultados revelaram que ocorreu um aumento na hidrólise de ATP, ADP e AMP e alterações na expressão gênica das ectonucleotidases em larvas de peixe-zebra. Estes dados diferem dos resultados obtidos previamente por Delwing e colaboradores (2007), que demonstraram que a administração aguda de arginina inibe a hidrólise dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP em ratos. O aumento observado na hidrólise dos nucleotídeos em larvas de peixe-zebra pode ser relacionado com a tentativa de aumentar a formação de adenosina, sugerindo um papel



neuroprotetor desse nucleosídeo frente à exposição a altos níveis de arginina nas fases iniciais do desenvolvimento.

A exposição aguda de arginina em peixes adultos não alterou nenhum dos parâmetros bioquímicos, comportamentais e moleculares analisados, demonstrando que a arginina é capaz de alterar a neurotransmissão purinérgica no cérebro em desenvolvimento, mas não em animais adultos. Esse resultado ainda sugere o envolvimento das proteínas Rh, que já estão completamente expressas na fase adulta, evitando com que altos níveis de amônia causem prejuízos ao SNC, em contraste, do que ocorre nas fases iniciais do desenvolvimento, onde as proteínas Rh estão pouco expressas (Braun et al., 2009) e por isso podem estar contribuindo com a toxicidade induzida pela arginina.

O presente estudo demonstrou que o tratamento agudo com arginina foi capaz de alterar o controle do desenvolvimento cerebral nas fases iniciais do desenvolvimento de peixe-zebra, fato este que não ocorreu durante a exposição de peixes-zebra adultos. O efeito modulatório da sinalização purinérgica pode estar ser relacionado com esse período crítico do desenvolvimento, no qual o cérebro estabelece mecanismos compensatórios para atingir o equilíbrio na vida adulta, além de ser um alvo para os efeitos neurotóxicos induzidos pela exposição à arginina.

## REFERÊNCIAS

- Abbracchio MP., Burnstock G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol.* 78(2):113-45, 1998.
- Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev.* 58(3):281-341, 2006.
- Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* 32:19-29, 2009.
- Antonioli L, Fornai M, Colucci R, Ghisu N, Tuccori M, Del Tacca M, Blandizzi C. Pharmacological modulation of adenosine system: novel options for treatment of inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis.* 14: 566-574, 2008.
- Appelbaum L, Skariah G, Mourrain P, Mignot E. Comparative expression of p2x receptors and ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in hypocretin and sensory neurons in zebrafish. *Brain Res.* 12: 66-75, 2007.
- Ash DE, Scolnick LR, Kanyo ZF, Vockley JG, Cederbaum SD, Christianson DW. Molecular basis of hyperargininemia: structure-function consequences of mutations in human liver arginase. *Mol Genet Metab.* 64(4):243-9, 1998.
- Ash DE. Structure and function of arginases. *J Nutr.* 134:2765-67, 2004.
- Bandmann O, Burton EA. Genetic zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis.* 40(1):58-65, 2010.

- Barimo JF, Steele SL, Wright PA, Walsh PJ. Dogmas and controversies in the handling of nitrogenous wastes: ureotely and ammonia tolerance in early life stages of the gulf toadfish, *Opsanus beta*. *J Exp Biol.* 207(Pt 12):2011-20. 2004.
- Berghmans S, Hunt J, Roach A, Goldsmith P. Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Res.* 75(1):18-28, 2007.
- Bertelli M, Cecchin S, Lapucci C, Jacomelli G, Jinnah HA, Pandolfo M, Micheli V. Study of the adenosinergic system in the brain of HPRT knockout mouse (Lesch-Nyhan disease). *Clin Chim Acta.* 373:104-7, 2006.
- Bertrand S, Ng GY, Purisai MG, Wolfe SE, Severidit MW, Nouel D. The anticonvulsant, antihyperalgesic agent gabapentin is an agonist at brain gamma-aminobutyric acid type B receptors negatively coupled to voltage-dependent calcium channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 298: 15-24, 2001.
- Bianchi V, Spsychala J. Mammalian 5'-nucleotidases. *J Biol Chem.* 278(47): 46195-46198, 2003.
- Bigonnesse F, Lévesque SA, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJ, Sévigny J. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry.* 43(18):5511-19, 2004.
- Blank M, Guerim LD, Cordeiro RF, Vianna MR. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiol Learn Mem.* 92(4):529-34, 2009.
- Boehmler W, Petko J, Woll M, Frey C, Thisse B, Thisse C, Canfield VA, Levenson R. Identification of zebrafish A2 adenosine receptors and expression in developing embryos. *Gene Expr Patterns.* 9 (3):144-51, 2009.

- Boison D. Adenosine and epilepsy: from therapeutic rationale to new therapeutic strategies. *Neuroscientist*. 11(1):25-36, 2005.
- Boison D. Adenosine as a modulator of brain activity. *Drug News Perspect*. 20(10):607-11, 2007.
- Braun MH, Steele SL, Perry SF. The responses of zebrafish (*Danio rerio*) to high external ammonia and urea transporter inhibition: nitrogen excretion and expression of rhesus glycoproteins and urea transporter proteins. *J Exp Biol*. 212(Pt 23):3846-56, 2009.
- Brejč K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van der Oost J, Smit AB, Sixma TK. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* 411: 269–276, 2001.
- Brown DA, Sihra TS. Presynaptic signaling by heterotrimeric G-proteins. *Handb Exp Pharmacol*. 184:207-60, 2008.
- Brusilow SW, Horwich A. Urea cycle enzymes. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th ed. McGraw-Hill, Inc, New York: E-Publishing Inc 2001. p.1909–1963.
- Burne T, Scott E, van Swinderen B, Hilliard M, Reinhard J, Claudianos C, Eyles D, McGrath J. Big ideas for small brains: what can psychiatry learn from worms, flies, bees and fish? *Mol Psychiatry*. 16(1):7-16, 2011.
- Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*. 24: 509-581, 1972.
- Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Straub RW, Bolis L (Editors), *Cell membrane receptors for drugs and hormones: A multidisciplinary approach*. New York: Raven Press. 107-118, 1978.
- Burnstock G. Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol*. 4:47-52, 2004.

- Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol.* 240:31-304, 2004.
- Burnstock G. Purinergic signalling--an overview. *Novartis Found Symp.* 276:26-48, 2006.
- Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci.* 12:1471-83, 2007.
- Burnstock G, Ulrich H. Purinergic signaling in embryonic and stem cell development. *Cell Mol Life Sci.* 68:1369- 94, 2011.
- Cachat J, Stewart A, Grossman L, Gaikwad S, Kadri F, Chung KM, Wu N, Wong K, Roy S, Suciu C, Goodspeed J, Elegante M, Bartels B, Elkhayat S, Tien D, Tan J, Denmark A, Gilder T, Kyzar E, Dileo J, Frank K, Chang K, Utterback E, Hart P, Kalueff AV. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nat Protoc.* 5(11):1786-99, 2010.
- Chadwick TD, Wright PA. Nitrogen excretion and expression of urea cycle enzymes in the atlantic cod (*Gadus morhua* l.): a comparison of early life stages with adults. *J Exp Biol.* 202 (Pt 19):2653-62. 1999.
- Chen GJ, Harvey BK, Shen H, Chou J, Victor A, Wang Y. Activation of adenosine A3 receptors reduces ischemic brain injury in rodents. *J Neurosci Res.* 84(8):1848-55, 2006.
- Chen TH, Wang YH, Wu YH. Developmental exposures to ethanol or dimethylsulfoxide at low concentrations alter locomotor activity in larval zebrafish: implications for behavioral toxicity bioassays. *Aquat Toxicol.* 102(3-4):162-6, 2011.
- Childs B, Valle D. Genetics, biology and disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 1:1-19, 2000.
- Choi S, Park C, Ahn M, Lee JH, Shin T. Immunohistochemical study of arginase 1 and 2 in various tissues of rats. *Acta Histochem.* 2011.
- Cognato GP, Bonan CD. Ectonucleotidases and Epilepsy. *The Open Neuroscience Journal.* 4, 44-52, 2010.

- Crombez EA, Cederbaum SD. Hyperargininemia due to liver arginase deficiency. *Mol Genet Metab.* 84(3): 243-51, 2005.
- Dahm R, Geisler R. Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Mar Biotechnol (NY).* 8(4):329-45, 2006.
- Dahme T, Katus HA, Rottbauer W. Fishing for the genetic basis of cardiovascular disease. *Dis Model Mech.* 2(1-2):18-22, 2009.
- Deignan JL, Cederbaum SD, Grody WW. Contrasting features of urea cycle disorders in human patients and knockout mouse models. *Mol Genet Metab.* 93(1):7-14, 2008.
- Delwing D, Gonçalves MC., Sarkis JJ., Wyse TS. L-NAME administration prevents the inhibition of nucleotide hydrolysis by rat blood serum subjected to hiperargininemia. *mino Acids.* 29:267-72, 2005.
- Delwing D, Delwing D, Sarkis JJ., Wyse AT. Proline induces alterations on nucleotide hydrolysis in synaptosomes from cerebral cortex of rats. *Brain Res.*2007;32:210-5.
- Dias-Hernandez M, Cox JA, Migita K, Haines W, Egan TM, Voigt MM. Cloning and characterization of two novel zebrafish P2X receptor subunits. *Biochem Biophys Res Com.* 295: 849-853, 2002.
- Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavello PR, Elegante MF, Elkhayat SI, Bartels BK, Tien AK, Tien DH, Mohnot S, Beeson E, Glasgow E, Amri H, Zukowska Z, Kalueff AV. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res.* 14;205(1):38-44, 2009.
- Erb L, Liao Z, Seye CI, Weisman GA. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Arch.* 452: 552-562, 2006.
- Essex-Fraser PA, Steele SL, Bernier NJ, Murray BW, Stevens ED, Wright PA. Expression of four glutamine synthetase genes in the early stages of development of rainbow trout

- (*Oncorhynchus mykiss*) in relationship to nitrogen excretion. *J Biol Chem.* 27;280(21):20268-73, 2005.
- Etherington LA, Frenguelli BG. Endogenous adenosine modulates epileptiform activity in rat hippocampus in a receptor subtype-dependent manner. *Eur J Neurosci.* 19(9):2539-50, 2004.
- Etchin J, Kanki JP, Look AT. Zebrafish as a model for the study of human cancer. *Methods Cell Biol.* 105:309-37, 2011.
- Feitsma H, de Bruijn E, van de Belt J, Nijman IJ, Cuppen E. Mismatch repair deficiency does not enhance ENU mutagenesis in the zebrafish germ line. *Mutagenesis.* 23(4):325-9, 2008.
- Fozard JR, Prakash NJ, Grove J. Ovarian function in the rat following irreversible inhibition of L-ornithine decarboxylase. *Life Sci.* 27:2277-83, 1980.
- Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacol.* 53 (4): 527-52, 2001.
- Fredholm BB. Adenosine receptors as targets for drug development. *Drug News Perspect.* 261:283-9, 2003.
- Fredholm BB, Chen JF, Cunha RA, Svenningsson P, Vaugeois JM. Adenosine and brain function *Int Rev Neurobiol.* 63:191-270, 2005.
- Finn RN, Kolarevic J, Kongshaug H, Nilsen F. Evolution and differential expression of a vertebrate vitellogenin gene cluster. *BMC Evol Biol.* 5;9:2, 2009.
- Ghisleni G, Capiotti KM, Da Silva RS, Oses JP, Piato AL, Soares V, Bogo MR, Bonan CD. The role of CRH in behavioral responses to acute restraint stress in zebrafish. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 10;36(1):176-82, 2011.

- Gilmour DT, Maischein HM, Nüsslein-Volhard C. Migration and function of a glial subtype in the vertebrate peripheral nervous system. *Neuron*.16;34(4):577-88, 2002.
- Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr. Opin. Pharmacol.* v. 4 n.5 p. 504-12, 2004.
- Gregory M, Jagadeeswaran P. Selective labeling of zebrafish thrombocytes: quantitation of thrombocytes function and deletion during development. *Blood Cells Mol Dis.* 29: 286-295, 2002.
- Green WN, Millar NS. Ion-channel assembly. *Trends Neurosci.* 18: 280–287, 1995.
- Grossman L, Utterback E, Stewart A, Gaikwad S, Chung KM, Suciuc C, Wong K, Elegante M, Elkhayat S, Tan J, Gilder T, Wu N, Dileo J, Cachat J, Kalueff AV.Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. *Behav Brain Res.* 25;214(2):277-84, 2010.
- Guo, S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes Brain Behav.* v.3, p. 63–74, 2004.
- Hammarberg C, Schulte G, Fredholm BB. Evidence for functional adenosine A3 receptors in microglia cells. *J Neurochem.* 86:1051–54, 2003.
- Heine P, Braun N, Heilbronn A, Zimmermann H. Functional characterization of rat ecto-ATPase and ecto-ATP diphosphohydrolase after heterologous expression in CHO cells. *Eur J Biochem.* 262(1):102-7, 1999.
- Hortopan GA, Dinday MT, Baraban SC. *Dis Model Mech.* Zebrafish as a model for studying genetic aspects of epilepsy. 3(3-4):144-8, 2010.
- Hougaard DM. Polyamine cytochemistry: localization and possible functions of polyamines. *Int Rev Cytol.* 138:51-88, 1992.
- Hunsucker SA, Mitchell BS, Spsychala J. The 5'-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacol Ther.* 107(1):1-30, 2005.



- Hussl S, Boehm S. Functions of neuronal P2Y receptors. *Pflugers Arch.* 452(5):538-51, 2006.
- Irons TD, MacPhail RC, Hunter DL, Padilla S. Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish. *Neurotoxicol Teratol.* 32(1):84-90, 2009.
- Iyer RK, Yoo PK, Kern RM, Rozengurt N, Tsoa R, O'Brien WE, Yu H, Grody WW, Cederbaum SD. Mouse model for human arginase deficiency. *Mol Cell Biol.* 22:4491-8, 2002.
- Kim MJ, Choi SJ, Lim S, Kim HK, Kim YJ, Yoon HG, Shin DH. Zeatin Supplement Improves Scopolamine-Induced Memory Impairment in Mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 72(2): 577-581, 2008.
- Kucenas S, Li Z, Cox JA, Egan TM, Voigt MM. Molecular characterization of the zebrafish P2X receptor subunit gene family. *Neuroscience.* 121: 935–945, 2003.
- Kucenas S, Cox JA, Soto F, LaMora A, Voigt MM. Ectodermal P2X receptor function plays a pivotal role in craniofacial development of the zebrafish. *Purinergic Signal.* 5: 395-407, 2009.
- Larson ET., O'Malley DM. & Melloni JR. Aggression and vasotocin are associated with dominant-subordinate relationships in zebrafish. *Behav Brain Res.* v.167 p.94-102, 2006.
- Latini S, Pedata F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J Neurochem.* 79(3):463-84, 2001.
- Lee HT, Kim M, Joo JD, Gallos G, Chen JF, Emala CW. A3 adenosine receptor activation decreases mortality and renal and hepatic injury in murine septic peritonitis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 291(4):959-69, 2006.
- Lee A, Mathuru AS, Teh C, Kibat C, Korzh V, Penney TB, Jesuthasan S. *Curr Biol.* The habenula prevents helpless behavior in larval zebrafish. 21;20(24):2211-6, 2010.

- Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet.* 8(5):353-67, 2007.
- Marescau B, De Deyn PP, Lowenthal A, Qureshi IA, Antonozzi I, Bachmann C, Cederbaum SD, Cerone R, Chamoles N, Colombo JP, et al. Guanidino compound analysis as a complementary diagnostic parameter for hyperargininemia: follow-up of guanidino compound levels during therapy. *Pediatr Res.* 27(3):297-303, 1990.
- Nachmansohn, D. & Machado, A. L. J. *Neurophy Biol.* 6, 397, 1943.
- Nelson JS. *Fishes of the world.* 3rd edn. Wiley, New York. 1994.
- North RA, Verkhratsky A. Purinergic transmission in the central nervous system. *Pflugers Arch.* 452(5):479-85, 2006.
- Parichy DM. Evolution of danio pigment pattern development. *Heredity.* v.97 p. 200-210 2006a.
- Pegg AE, Seely JE, Pösö H, della Ragione F, Zagon IA. Polyamine biosynthesis and interconversion in rodent tissues. *Fed Proc.* 41:3065-72, 1982.
- Piato ÂL, Capiotti KM, Tamborski AR, Oses JP, Barcellos LJ, Bogo MR, Lara DR, Vianna MR, Bonan CD. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 0;35(2):561-7, 2011.
- Ravelic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Ver.* 50: 413-92, 1998.
- Reis EA, de Oliveira LS, Lamers ML, Netto CA, Wyse AT. Arginine administration inhibits hippocampal Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity and impairs retention of an inhibitory avoidance task in rats. *Brain Research.* 2002;951:151-7.
- Ribeiro JA, Sebastião AM, de Mendonça A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog Neurobiol.* 68: 377-392, 2002.

- Ricatti MJ, Alfie LD, Lavoie EG, Sévigny J, Schwarzbaum PJ, Faillace MP. Immunocytochemical localization of NTPDases 1 and 2 in the neural retina of mouse and zebrafish. *Synapse*. 63(4):291-307, 2009.
- Rico EP, Senger MR, Fauth MG, Dias RD, Bogo MR, Bonan, CD. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci*. 73 (16), 2071–82, 2003.
- Rico EP, Rosemberg DB, Senger MR, Arizi MB, Bernardi GF, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Methanol alters ecto-nucleotidases and acetylcholinesterase in zebrafish brain. *Neurotoxicol Teratol*. 28: 489–496, 2006.
- Riehl R, Kyzar E, Allain A, Green J, Hook M, Monnig L, Rhymes K, Roth A, Pham M, Razavi R, Dileo J, Gaikwad S, Hart P, Kalueff AV. Behavioral and physiological effects of acute ketamine exposure in adult zebrafish. *Neurotoxicol Teratol*. 33(6):658-67, 2011.
- Rinkwitz S, Mourrain P, Becker TS. Zebrafish: an integrative system for neurogenomics and neurosciences. *Prog Neurobiol*. 93(2):231-43, 2011.
- Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*. 2:409–30, 2006.
- Rocha JC, Siqueira S, Cabral A, Almeida MF. Consenso para o tratamento nutricional das Doenças do Ciclo da Uréia. *Acta Pediatr Port*. 40 (2):83-93- 2009.
- Rombough PJ. Gills are needed for ionoregulation before they are needed for O<sub>2</sub> uptake in developing zebrafish, *Danio rerio*. *J Exp Biol*. 205: 1787–1794, 2002.
- Rosemberg DB, Rico EP, Langoni AS, Spinelli JT, Pereira TC, Dias RD, Souza DO, Bonan CD, Bogo MR. NTPDase family in zebrafish: Nucleotide hydrolysis, molecular identification and gene expression profiles in brain, liver and heart. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 155(3):230-40, 2010.

- Sager JJ, Bai Q, Burton EA. Transgenic zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Brain Struct Funct.* 114(2-3):285-302, 2010.
- Savio LE, Vuaden FC, Piato AL, Bonan CD, Wyse AT. Behavioral changes induced by long-term proline exposure are reversed by antipsychotics in zebrafish. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2012 Mar 30;36(2):258-63,2011.
- Scaglia F, Lee B. Clinical, biochemical, and molecular spectrum of hyperargininemia due to arginase I deficiency. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 142C:113-20, 2006.
- Schilling T. The morphology of larval and adult zebrafish. In: *Zebrafish.* (eds. C. Nüsslein-Volhard, & R. Dahm) p.59-94. Oxford University Press, Oxford. (2002).
- Schetinger MR, Morsch VM, Bonan CD, Wyse AT. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors.* 31(2):77-9, 2007.
- Sedel F, Barnerias C, Dubourg O, Desguerres I, Lyon-Caen O, Saudubray JM. Peripheral neuropathy and inborn errors of metabolism in adults. *J Inherit Metab Dis.* 30:642–53, 2007.
- Seibt KJ, Oliveira Rda L, Rico EP, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Typical and atypical antipsychotics alter acetylcholinesterase activity and ACHE expression in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 150(1):10-5, 2009.
- Senger M.R., Rico E.P., Arizi M.B., Frazzon A.P, Dias R.D., Bogo M.R., Bonan C.D. Exposure to Hg<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> changes NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in central nervous system of zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology.* v.226, p. 229-237, 2006.
- Skaper SD, Debetto P, Giusti P. The P2X7 purinergic receptor: from physiology to neurological disorders. *FASEB J.* 24: 337-45, 2010.
- Spence R., Fatema MK., Ellis S., Ahmed, ZF & Smith, C. The diet, growth and recruitment of wild zebrafish (*Danio rerio*) in Bangladesh. *J Fish Biol.* v. 71, p. 304-309, 2007a.

- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 83(1):13-34, 2008.
- Stanojević I, Bjelobaba I, Nedeljković N, Drakulić D, Petrović S, Stojiljković M, Horvat A. Ontogenetic profile of ecto-5'-nucleotidase in rat brain synaptic plasma membranes. *Int J Dev Neurosci*. 2011;29:397-403.
- Stewart A, Cachat J, Wong K, Gaikwad S, Gilder T, DiLeo J, Chang K, Utterback E, Kalueff AV. Homebase behavior of zebrafish in novelty-based paradigms. *Behav Processes*. 85(2):198-203, 2010.
- Surprenant A, North RA. Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev Physiol*. 71: 333-59, 2009.
- Talwar PK, Jhingran AG. Inland fishes of India and adjacent countries. Oxford & I. B. H. Publishing, Calcutta, 1991.
- Tasatargil A, Sadan G, Karasu E, Ozdem S. Changes in atrium and thoracic aorta reactivity to adenosinergic and adrenergic agonists in experimental hyperhomocysteinemia. *J Cardiovasc Pharmacol*. 47:673-9, 2006.
- Turner CP, Seli M, Ment L, Stewart W, Yan H, Johansson B, Fredholm BB, Blackburn M, Rivkees SA. A1 adenosine receptors mediate hypoxia-induced ventriculomegaly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20:11718-22, 2003.
- Trincavelli ML, Daniele S, Martini C. Adenosine receptors: what we know and what we are learning. *Curr Top Med Chem*. 10: 860-77, 2010.
- Wittendorp MC, von Frijtag Drabbe Künzel J, Ijzerman AP, Boddeke HW, Biber K. The mouse brain adenosine A1 receptor: functional expression and pharmacology. *Eur J Pharmacol*. 487(1-3):73-9, 2004.
- Wong K, Elegante M, Bartels B, Elkhayat S, Tien D, Roy S, Goodspeed J, Suciuc C, Tan J, Grimes C, Chung A, Rosenberg M, Gaikwad S, Denmark A, Jackson A, Kadri

- F, Chung KM, Stewart A, Gilder T, Beeson E, Zapolsky I, Wu N, Cachat J, Kalueff AV. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res.* 2;208(2):450-7, 2010.
- Wright TW, Gigliotti F, Haidaris CG, Simpson-Haidaris PJ. Cloning and characterization of a conserved region of human and rhesus macaque *Pneumocystis carinii* gpA. *Gene.* 29;167(1-2):185-9. 1995.
- Wright PA, Campbell A, Morgan RL, Rosenberger AG, Murray BW. Dogmas and controversies in the handling of nitrogenous wastes: expression of arginase Type I and II genes in rainbow trout: influence of fasting on liver enzyme activity and mRNA levels in juveniles. *J. Exp Biol.* 207(12):2033-42, 2004.
- Xi Y, Noble S, Ekker M. Modeling neurodegeneration in zebrafish. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 11(3):274-82, 2011.
- Young MT. P2X receptors: dawn of the post-structure era. *Trends Biochem Sci.* 35: 83-90, 2010.
- Yu H, Iyer RK, Yoo PK, Kern RM, Grody WW, Cederbaum SD. Arginase expression in mouse embryonic development. *Mech Dev.* 115(1-2):151-5, 2002.
- Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 362:299–309, 2000.
- Zimmermann H. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. *Drug Dev.* 52 (1-2): 44-56, 2001.
- Zon LI; Peterson RT. In vivo drug discovery in the zebrafish. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, p. 35-44, 2005.

**ANEXOS**

**COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO PROTOCOLO PELO COMITÊ DE ÉTICA  
PARA O USO DE ANIMAIS (CEUA) DA PUCRS**

**PUBLICAÇÕES REALIZADAS DURANTE O CURSO DE MESTRADO**



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

Ofício CEUA 153/10


Porto Alegre, 16 de setembro de 2010.

Senhora Pesquisadora:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais avaliou seu protocolo de pesquisa intitulado: **"Avaliação do modelo de hiperargininemia sobre parâmetros neuroquímicos, moleculares e comportamentais em peixe zebra (*Danio rerio*): uma abordagem sobre o sistema purinérgico e colinérgico"** e solicita retornar com as modificações, em anexo, feitas pelo CEUA-PUCRS.

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

Atenciosamente,



Profª. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó  
Coordenadora do CEUA – PUCRS

Ilma. Sra.  
Profª. Dra. Carla Bonan  
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](mailto:ceua@pucrs.br)



**Artigos científicos publicados:**

1. Siebel AM, Rico EP, Capiotti KM, Piato AL, Cusinato CT, Franco TMA, Bogo MR, Bonan CD. In vitro effects of antiepileptic drugs on acetylcholinesterase and ectonucleotidases activities in zebrafish (*Dani rerio*) brain. **Toxicol In Vitro**. 24(4):1279-84. 2010.
2. Rozisky JR, da Silva RS, Adachi LS, Capiotti KM, Ramos DB, Bogo MR, Bonan CD, Sarkis JJ, Torres IL. Neonatal morphine exposure alters E-NTPDase activity and gene expression pattern in spinal cord and cerebral cortex of rats. **Eur J Pharmacol**. 10;642(1-3):72-6. 2010.
3. Seibt KJ, Oliveira Rda L, Zimmermann FF, Capiotti KM, Bogo MR, Ghisleni G, Bonan CD. Antipsychotic drugs prevent the motor hyperactivity induced by psychotomimetic MK-801 in zebrafish (*Danio rerio*). **Behav Brain Res**. 25;214(2):417-22. 2010.
4. Richetti SK, Blank M, Capiotti KM, Piato AL, Bogo MR, Vianna MR, Bonan CD. Quercetin and rutin prevent scopolamine-induced memory impairment in zebrafish. 2;217(1):10-5. **Behav Brain Res**. 2011.
5. Piato ÂL, Capiotti KM, Tamborski AR, Oses JP, Barcellos LJ, Bogo MR, Lara DR, Vianna MR, Bonan CD. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 30;35(2):561-7. 2011.

6. Piato AL, Rosemberg DB, Capiotti KM, Siebel AM, Herrmann AP, Ghisleni G, Vianna MR, Bogo MR, Lara DR, Bonan CD. Acute restraint stress in zebrafish: behavioral parameters and purinergic signaling. **Neurochem Res.** 36(10):1876-86.2011.
7. Seibt KJ, Piato AL, da Luz Oliveira R, Capiotti KM, Vianna MR, Bonan CD. Antipsychotic drugs reverse MK-801-induced cognitive and social interaction deficits in zebrafish (*Danio rerio*). **Behav Brain Res.** 10;224(1):135-9. 2011.
8. Ghisleni G, Capiotti KM, Da Silva RS, Oses JP, Piato AL, Soares V, Bogo MR, Bonan CD. The role of CRH in behavioral responses to acute restraint stress in zebrafish. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 10;36(1):176-82. 2011.
9. Siebel AM, Piato AL, Capiotti KM, Seibt KJ, Bogo MR, Bonan CD. PTZ-induced seizures inhibit adenosine deamination in adult zebrafish brain membranes. **Brain Res Bull.** 25;86 (5-6):385-9. 2011.
10. Rico EP, Rosemberg DB, Seibt KJ, Capiotti KM, Da Silva RS, Bonan CD. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. **Neurotoxicol Teratol.** 33(6):608-17. 2011.
11. Capiotti KM, Menezes FP, Nazario LR, Pohlmann JB, de Oliveira GM, Fazenda L, Bogo MR, Bonan CD, Da Silva RS. Early exposure to caffeine affects gene expression of adenosine receptors, DARPP-32 and BDNF without affecting sensibility and morphology of developing zebrafish (*Danio rerio*). **Neurotoxicol Teratol.** 33(6):680-5.2011.

**Congressos:**

**1. Trabalho:** Restraint stress alters zebrafish behaviour: role corticotrophin-releasing factor.

**Autores:** Ghislani GC, Capiotti KM, da Silva, RS, Soares V, Bogo MR, Bonan CD.

**Congresso:** XXV Reunião Anual da federação das Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE.

**Data:** 25 – 28 de Agosto de 2010.

**2. Trabalho:** Assessment of chronic stress in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and molecular parameters.

**Autores:** Ângelo Luis Piato, Katiucia Marques Capiotti, Angélica Rech Tamborski, Maurício Reis Bogo, Diogo Rizatto Lara, Monica Ryff Vianna, Carla Denise Bonan.

**Congresso:** XXXIV Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento – SBNeC.

**Data:** 8 – 11 de Setembro de 2010.

**3. Trabalho:** Morphine administration in early life alters e-NTPDases activity and gene expression pattern in spinal cord and cerebral cortex of rats.

**Autores:** Joanna Ripoll Rozisky, Rosane Souza da Silva, Lauren Spezia Adachi, Katiucia Marques Capiotti, Denise Barboza Ramos, Mauricio Reis Bogo, Carla Denise Bonan, Iraci Lucena da Silva Torres.

**Congresso:** The First Brazilian Purine Club Meeting.

**Data:** 23 – 25 de Agosto de 2011.

**4. Trabalho:** Effects of antiepileptic drugs on ectonucleotidase activities in Zebrafish (*Danio rerio*) brain.

**Autores:** Anna Maria Siebel, Eduardo Pacheco Rico, Katiucia Marques Capiotti, Ângelo Luis Piato, Mauricio Reis Bogo, Carla Denise Bonan.

**Congresso:** The First Brazilian Purine Club Meeting.

**Data:** 23 – 25 de Agosto de 2011.

**5. Trabalho:** Effect of acute exposure to arginine on ectonucleotidase and adenosine deaminase activities in zebrafish brain membranes (*Danio rerio*).

**Autores:** Nazário, L.R., Capiotti, K.M., Fazenda, L., Bogo, M.R., da Silva, R.S., Wyse, A.T., Bonan, C.D.

**Congresso:** XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE.

**Data:** 24 – 27 de Agosto de 2011.

**6. Trabalho:** Efeito da exposição à arginina sobre a atividade das membranas cerebrais de larvas e adultos de peixe-zebra (*Danio rerio*).

**Autores:** Nazário, L.R., Capiotti, K.M., Fazenda, L., Bogo, M.R., da Silva, R.S., Wyse, A.T., Bonan, C.D.

**Congresso:**

**Data:** 24 de Agosto de 2011.