

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Investigação dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 no desenvolvimento motor de larvas de zebrafish (*Danio rerio*) durante a janela desenvolvimental de 3-5 dias pós fertilização

Área de concentração: Fisiologia
Johnny Erick Martins Costa
Orientador: Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza
Coorientadora: Dra. Gisele Eva Bruch

Março 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Investigação dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 no desenvolvimento motor de larvas de zebrafish (*Danio rerio*) durante a janela desenvolvimental de 3-5 dias pós fertilização

Dissertação desenvolvida no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Área de concentração: Fisiologia
Johnny Erick Martins Costa
Orientador: Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza
Coorientadora: Dra. Gisele Eva Bruch

Março 2020

043 Costa, Johnny Erick Martins.

Investigação dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 no desenvolvimento motor de larvas de zebrafish (*Danio rerio*) durante a janela desenvolvimental de 3-5 dias pós fertilização [manuscrito] / Johnny Erick Martins Costa. - 2020.
84 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza. Coorientadora: Dra. Gisele Eva Bruch.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Dopamina. 3. Peixe-Zebra. 4. Neurogênese. 5. Comportamento motor. I. Souza, Bruno Rezende de. II. Bruch, Gisele Eva. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

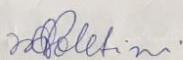
CDU: 612

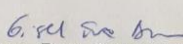
**"ESTUDO SOBRE O PAPEL DOS RECEPTORES
DOPAMINÉRGICOS D1 E D2 NO DESENVOLVIMENTO MOTOR
DE LARVAS DE ZEBRAFISH (DANIO RERIO) DURANTE A
JANELA DESENVOLVIMENTAL DE 3-5 DIAS PÓS
FERTILIZAÇÃO"**


JOHNNY ERICK MARTINS COSTA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 09 de março de 2020, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:


PROFA. DRA. DANIELE CRISTINA DE AGUIAR
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROFA. DRA. MARISTELA DE OLIVEIRA POLETINI
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROFA. DRA. GISELE EVA BRUCH
FAMINAS-BH
COORIENTADORA


PROF. DR. BRUNO REZENDE DE SOUZA
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 09 de março de 2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente as agências de financiamento e fomento à pesquisa, Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) por contribuir imensamente para existência desse trabalho e de muitos outros que são dependentes desse apoio financeiro, reitero a importância desses órgãos para o desenvolvimento econômico, social, cultural, ético e democrático no Brasil, sobretudo o avanço científico e os valores incalculáveis que são gerados a partir desses recursos. Estendo igualmente o agradecimento e a importância de todas Universidades Federais do Brasil, provida de seus respectivos cursos de graduação, pós graduação, extensão, ensino a distância em seus diversos níveis de disseminação da educação, formação pessoal e profissional, em especial a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e a Universidade Federal do Rio Grande (FURG) pelo compromisso, responsabilidade e respeito ao seu corpo discente e docente nacional e estrangeiro. Agradeço aos programas de Pós graduação Fisiologia e Biofísica – UFMG e Ciências Fisiológicas – FURG pela excelência e dedicação. Agradeço ao meu grupo de pesquisa, Núcleo de Neurociências (NNC - UFMG) por compartilhar incontáveis momentos de felicidades, aprendizado e confraternização. Agradeço especialmente com muito carinho e respeito, ao meu amigo, professor e orientador Dr. Bruno Rezende de Souza, pelo acolhimento, responsabilidade, compromisso, apoio, entendimento e profissionalismo, lhe agradeço por compartilhar a oportunidade, a credibilidade, o sonho, a humildade, a paixão pela ciência e o valor do trabalho. Agradeço também, com imensa singularidade, a minha Coorientadora Dra. Gisele Eva Bruch. Ao professor Dr. Cleiton Lopez pela amizade e os vários momentos de sorrisos, descontração e lazer, a Prof. Dra. Grace Schenatto por compartilhar sorrisos e alegrias, sobretudo a importância de uma postura sincera, verdadeira, firme, o apego e dedicação ao trabalho, aos professores Dr. Marcio Moraes e Dr. André Massesini pela acuidade, paixão, audácia, empolgação e pelo trabalho incansável de manter firme a pesquisa e o crescimento científico, profissional e diverso. Agradeço grandemente os profissionais que exercem o trabalho de limpeza e manutenção da UFMG. Agradeço a todos os amigos e colegas que surgiram nesse caminho, em especial, Caio Oliveira, Renan Oliveira, Francisco Carvalho, Dr. Flavio Mourão, Dr.

Daniel Oliveira, Dr. Leonardo Guarnieri, Cristiano Simões, Samir Salim, Vinicius Rezende, Matheus Herpich, Matheus, Caio Martins, Muiara Moraes, Alcione Medeiros, Ana Claudia, Ana Luiza, Barbara Fernandes, Julian, Emily Caroline, Natalia Silva, Cissa Moreira, Ana borges e Kevin Alvarenga. Aos amigos e professoras do Rio grande do Sul Dra. Daniele Barros, Dra. Ana Paula Horn, Cristian Norlobe, Dennis Costa, Andressa Costa, Linda Seregini e Marcos Cordeiro. Aos amigos familiares e irmão de longa data de minha querida cidade de Ribeirão das Neves e região, em especial minha mãe Rosiline Aparacida e meu pai Rosario Martins pelo amor, carinho, cuidado e fé. Ao meu grande amigo Leonardo Apgaua. Agradeço também os membros dessa banca o aceite do convite para avaliar esse trabalho. Muito Obrigado !!

Se você acredita que a educação custa caro,
experimente a ignorância !!

Derek Bok.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
RESUMO.....	17
ABSTRACT	18
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1.2 Receptores dopaminérgicos.....	5
1.1.3 Receptores dopaminérgicos tipo-D1	5
1.1.4 Receptores dopaminérgicos tipo-D2	6
1.1.5 Desenvolvimento do sistema dopaminérgico	8
1.1.6 Funções da sinalização dopaminérgica no desenvolvimento	9
2 ZEBRAFISH (Danio rerio) COMO MODELO EXPERIMENTAL	11
2.1.2 Evolução dos receptores dopaminérgicos no zebrafish	17
3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	19
4 HIPOTESE	19
5 OBJETIVO GERAL	20
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
5.1.1 Reprodução i.....	21
5.1.2 Coleta da desova e manutenção dos embriões ii.....	21
5.1.3 Manutenção das larvas iii.....	22
5.1.4 Análises morfológicas iv.....	22
5.1.5 Tratamento crônico e fármacos utilizados	23
5.1.6 Lavagem e manutenção das larvas pós tratamento	25
5.1.7 Divisão dos grupos	26
5.1.8 Análise do comportamento motor no escuro e exposição a luz	28
5.1.9. Análise estatística	28
6 RESULTADOS	29
6.1.1 Análise do comportamento motor.....	30
6.1.2 Larvas de zebrafish com 5 e 7 dpf apresentam comportamento motor diferentes em ambientes claro e escuro	30
6.1.1.2 Larvas de zebrafish com 5 dpf apresentam redução na latência para o primeiro episódio de movimento, no episódio de movimento e na duração cumulativa dos episódios de movimento:	30

6.1.1.3 A distância total e velocidade média percorrida por larvas com 5 dpf no escuro é maior quando comparada a exposição a luz:	31
6.1.1.4 Larvas com 7 dpf apresentam aumento de latência para o primeiro episódio de movimento mas redução nos outros parâmetros do comportamento motor em ambientes claros:.....	32
6.1.1.5 Redução da distância total e velocidade média percorrida no claro por larvas com 7 dpf:	34
6.2.1 Alteração na sinalização dopaminérgica na janela 3-5 dpf através da exposição à agonistas e antagonistas de receptores dopaminérgicos específicos altera o comportamento motor de larvas 5 dpf de formas distintas;.....	34
6.2.1.1 Antagonista de receptor D1 reduz a latência para o primeiro episódio de movimento em larvas com 5 dpf no escuro, mas não no claro:.....	34
6.2.1.2 Exposição ao antagonista de D2 na janela desenvolvimental 3-5 dpf da larva de zebrafish diminui o número de episódios de movimento no escuro a 5 dpf:	36
6.2.1.3 Larvas com 5dpf expostas ao agonista e ao antagonista de D2 apresentaram redução na duração cumulativa dos episódios de movimento: 38	
6.2.1.4 Larvas com 5 dpf expostas à dopamina e aos agonistas e antagonistas de D2 do 3 ao 5 dpf apresentam redução da distância total percorrida no escuro:.....	39
6.2.1.5 Larvas com 5 dpf expostas ao agonista ou ao antagonista do D2 entre 3-5 dpf apresentam redução da velocidade média no escuro:	41
6.3.1 Exposição de larvas de zebrafish a agonistas e antagonistas de receptores dopaminérgicos D1 ou D2, entre 3 e 5 dpf, altera parâmetros do comportamento motor aos 7 dpf de formas distintas no claro e no escuro	43
6.3.1.1 A exposição a agonista de D1 ou de D2 entre 3 e 5 dpf aumenta a latência para o primeiro episódio de movimento em larvas com 7 dpf no escuro:.....	43
6.3.1.2 Larvas com 7 dpf expostas ao agonista de D1 entre 3 e 5 dpf, apresentam redução no número de episódios de movimento:	45

6.3.1.3 Larvas expostas aos agonistas de D1 e D2 entre 3 e 5 dpf apresentam redução na duração cumulativa dos episódios de movimento com 7 dpf no escuro:.....	46
6.3.1.4 Larvas expostas ao agonista de receptores D1 ou D2 entre 3 e 5 dpf apresentaram diminuição na distância total percorrida no escuro aos 7 dpf: ..	48
6.1.3.5 A velocidade média de larvas com 7 dpf no escuro é menor nas larvas expostas aos agonistas de D1 ou de D2 entre 3 e 5 dpf:	50
7 DISCUSSÃO	56
8 CONCLUSÃO.....	64
9 REFERÊNCIAS.....	66

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Síntese de dopamina	2
Figura 2 - Vias e aferências dopaminérgicas	4
Figura 3 - Receptores tipo-D1	5
Figura 4 - Anatomia do encéfalo de osteíctes	11
Figura 5 - Visão do catecolaminérgico no zebrafish.....	14
Figura 6 - Desenho experimental	20
Figura 7 - Representação da larva de zebrafish em 3 dpf.....	23
Figura 8 – Lavagem das larvas pós exposição	25
Figura 9 – Divisão dos grupos.....	27
Figura 10 – Análises morfológicas	29
Figura 11.1a. Latência para o primeiro episódio de movimento (s) exibida durante 30 minutos no escuro e exposição a luz por larvas com 5 dpf..	31
Figura 11.1b. Episódio de movimento (nº) exibida durante 30 minutos no escuro e exposição a luz por larvas com 5 dpf.....	31
Figura 11.1c. Duração cumulativa dos episódios de movimento (s) exibidos durante 30 minutos no escuro e exposição a luz por larvas com 5 dpf.....	31
Figura 11.1d. Distância total percorrida (cm) exibida durante 30 minutos no escuro e exposição a luz por larvas com 5 dpf.....	32
Figura 11.1e. Velocidade média percorrida (cm/s) exibida durante 30 minutos no escuro e exposição a luz por larvas com 5 dpf.....	32
Figura 11.1f. Latência para o primeiro episódio de movimento (s) exibida durante 30 minutos no escuro e exposição a luz por larvas com 7 dpf.....	33
Figura 11.1g. Episódio de movimento (nº) exibida durante 30 minutos no escuro e exposição a luz por larvas com 7 dpf.....	33
Figura 11.1h. Duração cumulativa dos episódios de movimento (s) exibidos durante 30 minutos no escuro e exposição a luz por larvar com 7 dpf.....	33
Figura 11.1i. Distância total percorrida (cm) exibida durante 30 minutos no escuro e exposição a luz por larvas com 7 dpf.....	34
Figura 11.1j. Velocidade média percorrida (cm/s) exibida durante 30 minutos no escuro e exposição a luz por larvas com 7 dpf.....	34

Figura 11.1k. Latência para o primeiro episódio de movimento (s) exibida durante 30 minutos no escuro por larvas com 5 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf.....	35
Figura 11.1L. Latência para o primeiro episódio de movimento (s) exibida por larvas com 5 dpf no claro tratadas entre 3 e 5 dpf.....	35
Figura 11.1m. Latência para o primeiro episódio de movimento (s) exibida durante 30 minutos no escuro e no claro por larvas com 5 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf.....	36
Figura 11.1n. Número de episódios de movimento (n ⁰) exibido durante 30 minutos no escuro por larvas com 5 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf.....	37
Figura 11.1o. Número de episódios de movimento (n ⁰) exibido durante 30 minutos por larvas com 5 dpf no claro tratadas entre 3 e 5 dpf.....	37
Figura 11.1p. Número de episódios de movimento (n ⁰) exibido durante 30 minutos no escuro e no claro por larvas com 5 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf.....	37
Figura 10.1q. Duração cumulativa dos episódios de movimento (s) exibido durante 30 minutos no escuro por larvas com 5 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf.....	398
Figura 10.1r. Duração cumulativa dos episódios de movimento (s) exibido durante 30 minutos por larvas com 5 dpf no claro tratadas entre 3 e 5 dpf.....	38
Figura 10.1s. Duração cumulativa dos episódios de movimento (s) exibido durante 30 minutos no escuro e no claro por larvas com 5 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf.....	39
Figura 11.1t. Distância total percorrida (cm) durante 30 minutos no escuro por larvas com 5 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf.....	40
Figura 11.1u. Distância total percorrida (cm) durante 30 min por larvas com 5 dpf no claro tratadas entre 3 e 5 dpf.....	40
Figura 11.1v. Distância total percorrida durante 30 minutos no escuro e durante a exposição a luz por larvas com 5 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf.....	40
Figura 11.1w. Velocidade média percorrida (cm/s) durante 30 minutos no escuro por larvas com 5 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf.....	42
Figura 11.1x. Velocidade média percorrida (cm/s) durante 30 min por larvas com 5 dpf no claro tratadas entre 3 e 5 dpf.....	42
Figura 11.1y. Velocidade média percorrida durante 30 minutos no escuro e no claro por larvas com 5 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf.....	42
Figura 11.2a. Latência para o primeiro episódio de movimento (s) exibida durante 30 minutos no escuro por larvas com 7 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf.	44

Figura 11.2b. Latência para o primeiro episódio de movimento (s) exibida por larvas com 7 dpf no claro tratadas entre 3 e 5 dpf.....	44
Figura 11.2c. Latência para o primeiro episódio de movimento (s) exibida durante 30 minutos no escuro e no claro por larvas com 7 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf.....	44
Figura 11.2d. Episódio de movimento (no) exibida durante 30 minutos no escuro por larvas com 7 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf.....	45
Figura 11.2e. Episódio de movimento (no) exibida durante 30 minutos por larvas com 7 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf no claro.....	45
Figura 11.2f. Episódio de movimento (n0) exibida 30 minutos no escuro e no claro por larvas com 7 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf.....	46
Figura 11.2g. Duração cumulativa dos episódios de movimento (s) exibida durante 30 minutos no escuro por larvas com 7 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf.....	487
Figura 11.2h. Duração cumulativa dos episódios de movimento (s) exibida durante 30 min por larvas com 7 dpf no claro tratadas entre 3 e 5 dpf.....	47
Figura 11.2i. Duração cumulativa dos episódios de movimento (s) exibida 30 minutos no escuro e no claro por larvas com 7 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf.....	48
Figura 11.2j. Distância total percorrida (cm) durante 30 minutos no escuro por larvas com 7 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf.....	49
Figura 11.2k. Distância total percorrida (cm) durante 30 min por larvas com 7 dpf no claro tratadas entre 3 e 5 dpf.....	49
Figura 11.2L. Distância total percorrida durante 30 minutos no escuro e no claro por larvas com 7 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf.....	49
Figura 10.2m. Velocidade média percorrida (cm/s) durante 30 minutos no escuro por larvas com 7 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf.	51
Figura 10.2n. Velocidade média percorrida (cm/s) durante 30 min por larvas com 7 dpf no claro tratadas entre 3 e 5 dpf.....	51
Figura 10.2o. Velocidade média (cm/s) percorrida durante 30 minutos no escuro e no claro por larvas com 7 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf.....	51
Tabela 1. Correlação do circuito catecolaminérgico entre zebrafish e mamíferos.....	15
Tabela 2. Informações dos tratamentos e fármacos utilizados	24
Tabela 3. Resultados entre os grupos para condicao de exposicao a luz e escuro.....	52
Tabela 4. Resultados entre os grupos tratados.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AACD – L-Aminoácido aromático descarboxilase
AC – Adenilato ciclase
AC – adenilato ciclase
AC- Células amácrinas retiniais
act - trato anterior
Akt – proteína quinase-serina/treonina
AP – Área postrema
ATV – área tegmental ventral
cAMP - monofosfato cíclico de adenosina
Ce - Cerebelo
COMT – catecol-O-metiltransferase
CRTL – Grupos controles
D.O.B – estufa com demanda bioquímica de oxigênio
D_{2L} – Receptor D_{2like}
D₄rs – receptor de dopamina sequencia relacionada
DA – Grupos tratados com dopamina
DARPP-32 – Proteína de 32 kilodaltons
DAT – Transportadores de dopamina
DBH – dopamina-β-hidroxilas
DC – diencéfalo ventral
Dien- Diencéfalo
dpf – Dias pós fertilização
D_{sL} – Receptor sub tipo D₂ longo
D_{sS} – Receptor sub tipo D₂ curto
E – estágio embrionário
E3 - Meio de embrião
eht- trato endohipotalamico
Esc – escuro
ETI - Grupos tarados cronicamente com eticloprida
Exp. Luz – Exposição a luz
GABA – Ácido gama-aminobutírico
GPCRs - Receptores acoplados a proteína G

GSK3/β – proteína glicogênio síntese quinase
GTPγS - guanosina 5'-O- gama-tio trifosfato
H – hipotálamo
hpf – horas pós fertilização
LC - locus coeruleus
L-DOPA - l-3,4-di-hidroxifenilalanina
Mesen- Mesencéfalo
mlct - trato medial longitudinal
MO – medula oblonga
MSNs - *medium spiny neurons*
OB - bulbo olfatório
OECD - Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment mixtures. Environment Directorate. Paris; OECD; 2000
P - Palio
pc - comissura posterior
PKA – Proteína quinase A
PO - região pré-óptica
poc - comissura pós óptica
PP2A - A proteína fosfatase 2a
PP2A – Proteína fosfatase 2
Pr - pré tectum
prp - projeções pre tectais
prtep - projeções pretectotectal
QUIN - Grupos tratados cronicamente com quinpirole
SCH – Grupos tratados cronicamente com SCH - 23390
SKF – Grupos tratados cronicamente com SKF –38393
Sp - Subpalium
T – tectum
tc – tela coróide
TH – Tirosina hidroxilase
Thr - resíduos de treonina
Tien – telencéfalo
V – ventrículo

ZFIN - *The Zebrafish Information Network*

α – Alfa

β – Beta

γ – Gama

RESUMO

Distúrbios mentais são enfermidades altamente limitantes e prejudiciais. Investigações diversas, tem demonstrado a existência do desequilíbrio dopaminérgico nessas condições. Entretanto, poucos são os trabalhos que demonstram a participação da sinalização dopaminérgica durante a gênese cerebral e sua relação com esses distúrbios. Sabe-se que a dopamina tem diversas funções fisiológicas, incluindo comportamento motor voluntário, motivação, tomada de decisão, recompensa, processos imunológicos dentre outros. Além disso, a dopamina já é expressa em estágios iniciais de desenvolvimento e contribui para migração e diferenciação de neurônios durante a formação do cérebro. Porém, os mecanismos envolvidos na modulação do neurodesenvolvimento pela dopamina são pouco conhecidos. O desafio é ainda maior para estudar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento intrauterino. De acordo com esse conhecimento prévio, utilizamos larvas de zebrafish como ferramenta experimental para investigar o papel de receptores dopaminérgicos no desenvolvimento do comportamento motor.

Em trabalhos anteriores do nosso grupo, observamos que a sinalização dopaminérgica modula a fosforilação tanto de DARPP-32 quanto de Akt no cérebro de larvas com 3 e 5 dias pós-fertilização (dpf). Também foi demonstrado que o aumento de dopamina durante a janela desenvolvimental 3-5 dpf altera tanto o comportamento motor quanto o desenvolvimento do sistema GABAérgico. Recentemente, foi visto que algumas dessas alterações motoras se mantêm até o 14 dpf. Nesse trabalho, utilizamos ferramentas farmacológicas para investigar o papel dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 no desenvolvimento do comportamento motor. Nós observamos que as larvas tratadas com dopamina, agonista e antagonistas dos receptores D2, mas não agonistas e antagonistas do receptores D1, entre 3-5 dpf apresentaram redução do comportamento motor, tanto em 5 dpf quanto em 7 dpf. Porém, com 7 dpf, as larvas apresentaram leve recuperação. Curiosamente, também observamos diferenças quando o comportamento motor foi analisado no claro comparado com escuro sugerindo um componente aversivo.

Nossos resultados contribuem tanto para a compreensão do papel da sinalização dopaminérgica no desenvolvimento do cérebro quanto para o aperfeiçoamento do zebrafish como ferramenta experimental.

Palavras-chave: Dopamina. Zebrafish. Neurogênese. Comportamento motor.

ABSTRACT

Mental disorders are highly limiting and harmful diseases. Various investigations have shown the existence of a dopaminergic imbalance in these conditions. However, there are few studies that demonstrate the participation of dopaminergic signaling during brain genesis and its relationship with these disorders. It is known that dopamine has several physiological functions, including voluntary motor behavior, motivation, decision making, reward, immunological processes, among others. In addition, dopamine is already expressed in early stages of development and contributes to the migration and differentiation of neurons during brain formation. However, the mechanisms involved in the modulation of neurodevelopment by dopamine are poorly understood. The challenge is even greater to study the mechanisms involved in intrauterine development. According to this previous knowledge, we used zebrafish larva as an experimental tool to investigate the role of dopaminergic receptors in the development of motor behavior. In previous work by our group, we observed that dopaminergic signaling modulates the phosphorylation of both DARPP-32 and Akt in the brain of larvae with 3 and 5 days post-fertilization (dpf). It has also been shown that increased dopamine during the 3-5 dpf developmental window alters both motor behavior and the development of the GABAergic system. Recently it has been seen that some of these motor changes are maintained until 14 dpf. In this work, we used pharmacological tools to investigate the role of dopaminergic receptors D1 and D2 in the development of motor behavior. We observed that the larvae treated with dopamine, D2 receptor agonist and antagonists, but not D1 receptor agonists and antagonists, between 3-5 dpf showed a reduction in motor behavior, both in 5 dpf and in 7 dpf. However, with 7 dpf, the larvae showed slight recovery. Interestingly, we also observed differences when motor behavior was analyzed in the light compared to the dark, suggesting an aversive component. Our results contribute both to the understanding of the role of dopaminergic signaling in brain development and to the improvement of zebrafish as an experimental tool.

Keywords: Dopamine. Zebrafish. Neurogenesis. Motor behavior.

1 INTRODUÇÃO

Transtornos psiquiátricos são fenômenos limitantes e altamente prejudiciais para os pacientes, gerando dificuldades cognitivas, de humor, dificuldades de relacionamentos sociais, dentre outros, gerando gastos altamente alarmantes de acordo com as projeções econômicas (BLOOM *et al.*, 2017). O entendimento funcional dessas patologias é extraordinariamente relevante para estudos neurocientíficos, uma vez que o conhecimento gerado irá direcionar os recursos financeiros a fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes (MERSON; BLACK; MILLS, 2012).

Diversos neurotransmissores, tais como dopamina, serotonina, ácido gama amino butírico (GABA), dentre outros, têm sido cada vez mais apontados como fatores determinantes para o surgimento dessas doenças, como Esquizofrenia (BENES, 2000), Depressão (FU; FAN; DAVATZIKOS, 2020), Ansiedade (STEINER; FUCHS; ACCILI, 1997), Transtorno de humor (DIEHL; GERSHON, 1992; GARRIGA *et al.*, 2017) e Adição (TOMKINS; SELLERS, 2001).

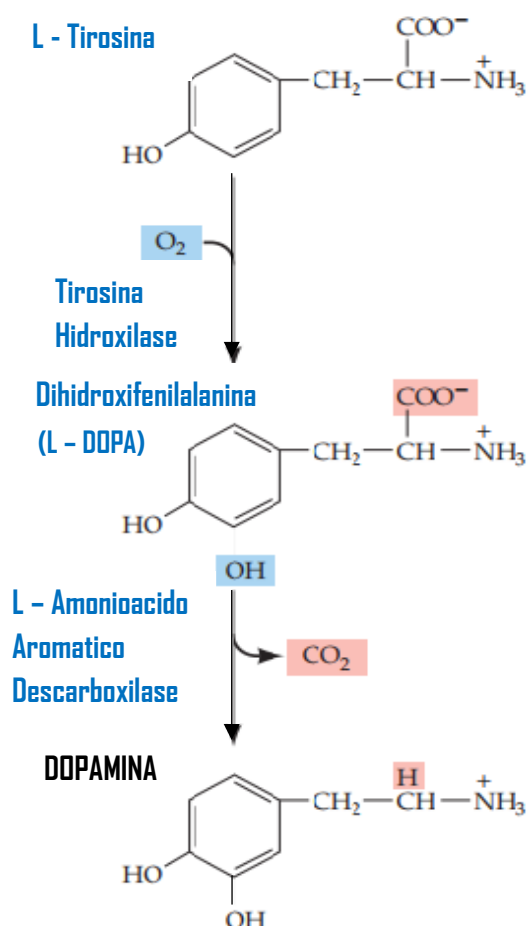
O desequilíbrio na sinalização destes neurotransmissores em estágios distintos de desenvolvimento, pode implicar no possível surgimento dessas patologias (RUGER, 2012). Dentre esses componentes moleculares, a dopamina concentra em si uma classe diversa de funções fisiológicas que podem gerar patologias de grave teor a partir de alterações disfuncionais em seus mecanismos modulatórios (BENES, 2000; CARLSSON, 2001; SOUZA, Bruno R. *et al.*, 2006; BJÖRKLUND; DUNNETT, 2007; WATANABE, 2008; PASTERKAMP; SMIDT; BURBACH, 2009). Sabe-se também, que a dopamina tem um papel fundamental na formação do cérebro, contribuindo para migração neuronal, arborização e diferenciação celular (TODD, 1992; SOUZA; ROMANO-SILVA; TROPEPE, 2011; CRANDALL *et al.*, 2007). De acordo com essa premissa, é possível que alterações na sinalização da dopamina durante o neurodesenvolvimento estejam envolvidas em alguns dos transtorno neuropsiquiátricos.

Sendo assim, como objetivo central, investigamos o papel da dopamina na fase inicial do desenvolvimento do cérebro no desenvolvimento do comportamento motor, uma vez que sua sinalização já é expressa nos estágios iniciais de desenvolvimento (CRANDALL *et al.*, 2007).

1.1 AÇÕES FISIOLÓGICAS DA DOPAMINA

A dopamina tem papel fundamental no sistema nervoso central, na regulação de movimento voluntário (CARLSSON, 2001), sono (MONTI; PANDI-PERUMAL; CHOKROVERTY, 2016) memória de trabalho (COOLS; D'ESPOSITO, 2011), afeição (DE BOER; VAN BUEL; TER HORST, 2012), recompensa e aprendizado (FITZGERALD; DOLAN; FRISTON, 2015). Paralelo a essas funções, a dopamina também atua no sistema periférico regulando a visão (WITKOVSKY; DEARRY, 1991), olfação (HARVEY; HEINBOCKEL, 2018), processos imunológico (VIDAL; PACHECO, 2019) e sistema simpático (GARLAND; BIAGGIONI, 1993).

Figura 1 – Síntese de dopamina



Esquema representativo da síntese de dopamina. O aminoácido L-tirosina sofre uma catalise via TH na presença do O₂, sintetizando a L-DOPA, que em seguida é alcançada pela AACD sintetizando a dopamina. Adaptado de (PURVES, 2018).

1.1.1 Síntese de dopamina e circuitos dopaminérgicos em mamíferos

O mesencéfalo contém uma quantidade maciça de neurônios e aferências dopaminérgicas (WILLIAMS; GOLDMAN-RAKIC, 1998), subdivido em camadas dorsais e ventrais, ambas innervando o estriado e neocórtex em primatas não humanos, humanos e roedores, exercendo funções inerentes a atividade da dopamina atuando sobre a classe diversa de receptores pré e pós-sinápticos (BJÖRKLUND; DUNNETT, 2007).

Pertencente ao grupo dos catecóis ligado a um grupamento amino, a dopamina contém na sua primeira etapa de síntese a partir do aminoácido L-tirosina, uma reação catalisada via tirosina hidroxilase (TH), tendo como co-substrato o oxigênio originando o precursor 1-3,4-di-hidroxiifenilalanina (L-DOPA). Essa etapa é crucial para controlar a velocidade de síntese de dopamina. Em

seguida a L-DOPA é alcançada pela L-aminoácido aromático descarboxilase (AACD) e permite a síntese de dopamina (Fig. 1) (BARBEAU, 1969; KIM; FROELICK; PALMITER, 2002). A partir desse ponto, a dopamina está hábil para atuar sobre os receptores disponíveis tanto em neurônios pós-sinápticos quanto pré-sinápticos e exercer suas funções conforme as demandas biológicas (PURVES, DALE, 2018). Em seguida, a dopamina pode ser recaptada para os neurônios pré- sinápticos através de transportadores de dopamina (DAT) ou ser degradada ainda na fenda sináptica por outros alvos moleculares (MCHUGH; BUCKLEY, 2015).

Aferências mais detalhadas dos circuitos dopaminérgicos e suas distribuições foram descritas a partir de métodos de fluorescência por formaldeído em tecido cerebral de ratos, doze tipos de grupamentos neuronais catecolaminérgicos (A1 - A12) foram identificados inervando a medula oblonga e hipotálamo (BJÖRKLUND; FALCK; STENEVI, 1971). Adicionalmente, cinco grupos neuronais (A13 - A17) foram inseridos no diencéfalo, retina e bulbo olfatório, e mais três grupos celulares do tipo adrenalina também foram inseridos (C1 -C3) (PALKOVITS; BROWNSTEIN, 1989). A marcação da maquinaria enzimática intracelular envolvida na síntese, a partir da reação catalisada pelo complexo aminoácido L-tirosina, TH e finalmente a ação da AACD e sua degradação via catecol-O- metiltransferase (COMT), ampliou o conhecimento e a disposição das vias dopaminérgicas em larga escala de diversos modelos experimentais (Björklund and Dunnett, 2007).

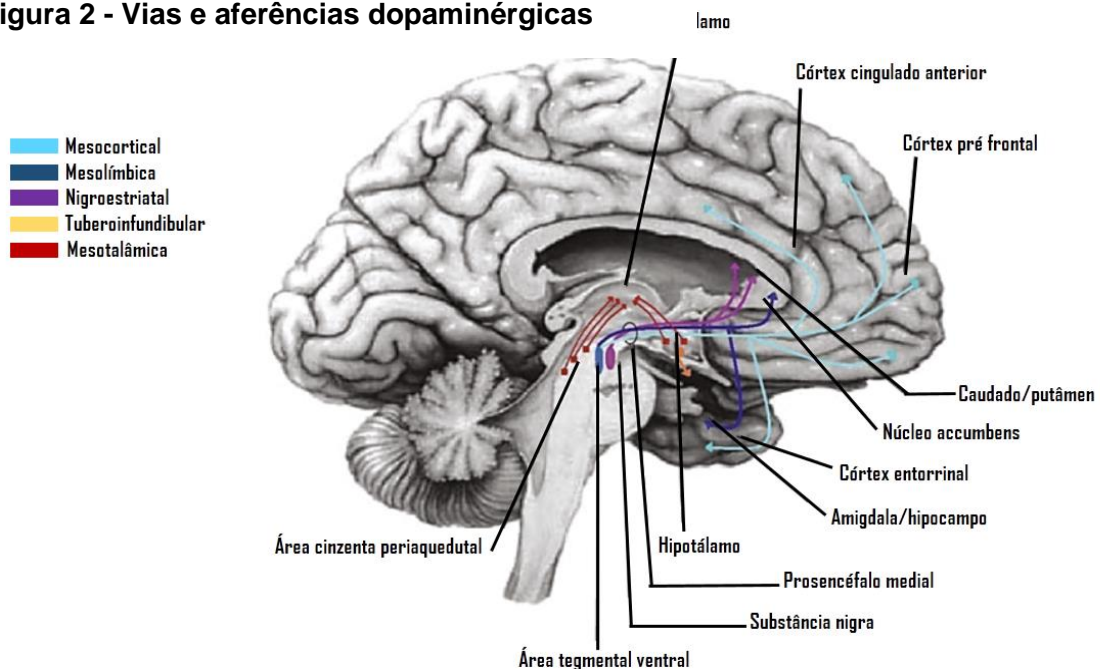
Sabe-se hoje, que o sistema dopaminérgico é constituído de uma estrutura definida em quatro vias principais descritas em mamíferos (SHIN *et al.*, 2011): (1) mesolímbica; contém grupamento de neurônios que partem da área tegmental ventral (ATV- A10) e projetam para o núcleo accumbens e regiões límbicas, e são relacionadas aos comportamentos de recompensa, prazer, afeição, adição e motivação (Puglisi-Allegra and Ventura, 2012); (2) mesocortical; contém grupamento de neurônios da ATV - A10 que projetam para regiões mais subjacentes no córtex pré-frontal e modulam motivação, memória de trabalho, atenção, aprendizado e controle cognitivo (ROBBINS; ARNSTEN, 2009); (3) nigroestriatal; contém grupamento de neurônios área A9 na substância nigra e projetam para o estriado dorsal, e regulam funções motoras (IVERSEN; IVERSEN, 2007); e por fim (4) tuberoinfundibular, que contém grupamento de neurônios área A8 no hipotálamo e projetam para a eminência

mediana da glândula pituitária modulando a liberação de prolactina, compondo uma fração do eixo hormonal (GUDELSKY, 1988) (Fig. 2).

No entanto, essa descrição tem caráter sumarizado, uma vez que neurônios da A9 também enviam projeções para regiões límbicas e corticais, bem como a A10 enviam projeções para o estriado ventral e núcleo caudado, há também uma projeção originada no tálamo em direção a substância paraquedutal cinzenta e hipotálamo.

Além disso, uma extensão da Nigro estriatal A8 contém projeções para os eixos mesolímbicos, mesocorticais e estriado. Porém, essa caracterização secundária ainda não é bem compreendida de acordo com funcionalização do sistema dopaminérgico (PALKOVITS; BROWNSTEIN, 1989).

Figura 2 - Vias e aferências dopaminérgicas



Visão geral das vias dopaminérgicas em mamíferos. As setas representam os locais de projeção. Via mesocortical (azul), via mesolímbica (azul escuro), Nigroestriatal (roxo), Tuberoinfundibular (laranja). Uma quarta via ainda não bem caracterizada, descrita como mesotalâmica representada em vermelho, e sua projeção em direção ao hipotálamo e área paraquedutal. Adaptado (SCHATZBERG; NEMEROFF, 2004; SZABO; GOULD; MANJI, 2004).

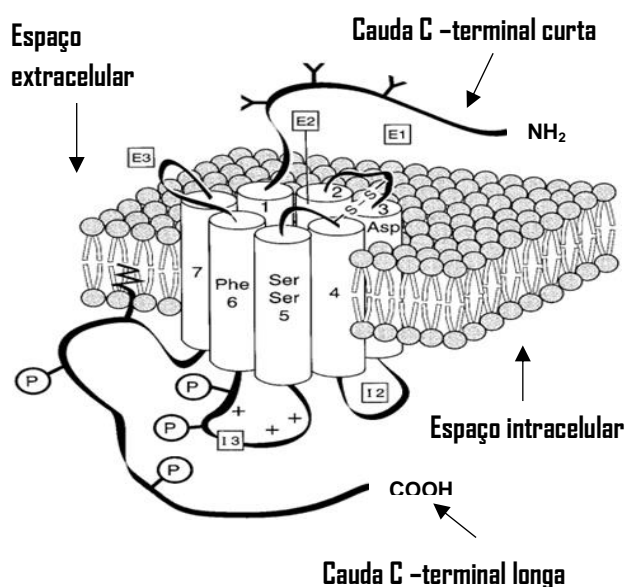
1.1.2 Receptores dopaminérgicos

Os 5 receptores dopaminérgicos são separados em duas famílias, denominadas receptores tipo-D1 e tipo-D2 (SEEMAN; VAN TOL, 1994). Ambos contêm estrutura e genoma bem definidos em mamíferos (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011).

A classificação dos receptores é inerente à capacidade de modular a produção ou redução de segundos mensageiros via ativação (tipo-D1) e inibição (tipo-D2) da adenilato ciclase (AC), através de um complexo heterodimérico transmembrana constituído pelas subunidades Alfa (α), Beta (β) e Gama (γ) (KESHELAVA *et al.*, 2018; VALLONE; PICETTI; BORRELLI, 2000). Inicialmente, acreditava-se que somente um dos grupos estaria hábil para ativar a AC (SPANO; GOVONI; TRABUCCHI, 1978), contudo, trabalhos subsequentes baseado em técnicas de clonagem, permitiram a separação das classes de acordo com suas propriedades farmacológicas e funcionais (KEBABIAN, J. W.; CALNE, 1979; BUNZOW *et al.*, 1988).

1.1.3 Receptores dopaminérgicos tipo-D1

Figura 3 - Receptores tipo-D1



Representação estrutural dos receptores de dopamina tipo-D1. No espaço extracelular é possível observar a cauda N-terminal curta (NH_2) e a cauda C-terminal longa (COOH) no espaço intracelular. Adaptado (MISSALE *et al.*, 1998).

A família dos receptores tipo-D1, subdivido em subtipos D₁ (*DRD1* - 5q35.1) e D₅ (*DRD5* - 4p16.1), detém cerca de 80% de homologia entre si e não apresenta introns em sua face codificadora, contendo um loop citoplasmático curto e uma cauda C-terminal longa. A presença de resíduos de serina e treonina na cauda C-terminal contribuem para o mecanismo de fosforilação (Fig. 3) (MISSALE *et al.*, 1998). Os receptores do subtipo-D₁ estão amplamente distribuídos na região nigroestriatal, mesolímbica, mesocortical tais como, caudado-putamen (estriado), núcleo

accumbens, substância nigra, córtex pré-frontal, amígdala, bulbo olfatório e em menor densidade, no hipotálamo, cerebelo, regiões talâmicas, hipotalâmicas e *medium spiny neurons* (MSNs) GABAérgicos (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011; VALLONE; PICETTI; BORRELLI, 2000; SHUEN *et al.*, 2008).

Já os receptores do subtipo D₅ se concentram em regiões contendo neurônios piramidais, múltiplas regiões do córtex pré-frontal, córtex pré-motor, córtex cingulado, córtex entorrinal, substância nigra, hipotálamo, hipocampo, giro denteado e MSNs (MISSALE *et al.*, 1998; SHUEN *et al.*, 2008). Ambos receptores estão presentes predominantemente nos terminais pós-sinápticos e modulam a cascata intracelular pela ativação de AC e a produção de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), uma vez que esses receptores estão acoplados a face estimulatória G_s/olf da proteína G (SIBLEY; MONSMA, 1992; VALLONE; PICETTI; BORRELLI, 2000; VALLONE; PICETTI; BORRELLI, 2000; MISSALE *et al.*, 1998). Os altos níveis de cAMP tem como propriedade ativar proteína quinase A (PKA) que por sua vez irá atuar sobre outros substratos, entre eles uma proteína de 32 kilodaltons denominada DARPP-32 (NISHI; SNYDER; GREENGARD, 1997). Esses mecanismos intracelulares, estão envolvidos em uma classe diversa de funções celulares, a partir de regulação genica e síntese proteica que geram fenômenos comportamentais de acordo com a sinalização da dopamina (NISHI; SNYDER; GREENGARD, 1997; ALBERT, KATHERINE A. *et al.*, 2002; BIBB *et al.*, 1999; GIRAULT *et al.*, 1989; ANDERSSON *et al.*, 2005; SVENNINGSSON *et al.*, 2000).

1.1.4 Receptores dopaminérgicos tipo-D2

Uma segunda família de receptores dopaminérgicos, classificada como tipo-D2, é composta pelos subtipos D₂ (DRD2 - 11q23.1), D₃ (DRD3 - 3q13.3) e D₄ (DRD4 - 11p15.5) (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011). Eles contém estrutura semelhante aos receptores do tipo-D₁, porém a estrutura C-terminal dos receptores tipo-D2, exhibe sete vezes menos grupamentos aminos que a família tipo-D1 (SOKOLOFF *et al.*, 2006). Sobretudo, apresentam mecanismos intracelulares distintos e estão dispostos em neurônios pré- e pós-sinápticos, compondo entre si aproximadamente 53 a 75% de homologia (SOKOLOFF *et al.*, 2006; MISSALE *et al.*, 1998). Em linhas gerais, o mecanismo funcional dessa classe atua reduzindo a produção de cAMP pelo mecanismo inibitório da AC, uma vez que os receptores tipo-

D2 pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína Gi/o (KEBABIAN, JOHN W.; GREENGARD, 1971). Além disso, essa classe exibe mecanismos de ação independente de cAMP, que atuam através de um complexo quinase-serina/treonina (Akt) concomitante a regulação de glicogênio síntese quinase (GSK3/β) (BEAULIEU, Jean-Martin *et al.*, 2005). Essa ativação, atua inibindo a Akt por desfosforilação da Thr 308 via proteína fosfatase 2A (PP2A) permitindo a ativação de GSK3/β compondo comportamentos via receptores tipo-D2 (BEAULIEU, Jean-Martin *et al.*, 2005; SOUZA; ROMANO-SILVA; TROPEPE, 2011).

O subtipo D₂ foi o primeiro a ser clonado demonstrando, em seu complemento genômico, seis regiões não codificadoras (ALBERT, PAUL R. *et al.*, 1990; DAL TOSO *et al.*, 1989). A ação variante de *Splice* em 87 pares de base do tipo exon entre os introns 4 e 5 permitiu a existência de 29 aminoácidos no terceiro loop citoplasmático, que gerou duas isoformas descritas como subtipo D₂S (D₂- curto) e D₂L (D₂-longo) (GIROS *et al.*, 1989). Ambos contêm estrutura anatômica, fisiologia e mecanismos de sinalização similares. A isoforma D₂S existe em maioria nos terminais pré-sinápticos, compondo fenômenos de auto regulação no limiar de disparo e na secreção de dopamina, enquanto a isoforma D₂L está, em sua maioria, nos terminais pós-sinápticos exercendo o papel de inibição via proteína G_{i/o}. Usielo e colaboradores (2000) realizaram um estudo observando a funcionalização de ambas isoformas. Neste trabalho, foi identificando a participação do subtipo D₂S exercendo mecanismo inibitório a atividade dos receptores do tipo-D₁, ao passo que o agonista seletivo (-) cloridrato-quinpirole ativa essa isoforma em neurônios pré-sinápticos inibindo a liberação de dopamina (USIELLO *et al.*, 2000). Em linhas gerais, o subtipo D₂ está distribuído no núcleo accumbens, tubérculo olfatório, estriado, e em maior densidade, na glândula pituitária, substância nigra, área tegmental ventral, áreas corticais, amígdala, *septum*, hipocampo, MSNs e em menor concentração na retina (SHUEN *et al.*, 2008; MISSALE *et al.*, 1998; SEEMAN; VAN TOL, 1994; VALLONE; PICETTI; BORRELLI, 2000).

O subtipo D₃ apresenta 5 regiões não codificadoras e tem um padrão mais limitado de distribuição no cérebro, podendo ser encontrado no tubérculo olfatório, MSNs regiões ventrais/dorsais do núcleo accumbens e *Islands of Calleja* (MISSALE *et al.*, 1998), e em menor expressão, na substância nigra, área tegmental

ventral e hipotálamo (SOKOLOFF *et al.*, 2006). Os mecanismos mediados por esse subtipo, também exibem auto regulação, ajuste na taxa de disparo, liberação e síntese de dopamina, uma vez que se encontram em terminais pré-sinápticos (LEVANT, 1997; WOLF; ROTH, 1990). Os receptores do subtipo D₃ são alvos críticos para o tratamento de distúrbios mentais, considerando a capacidade auto regulatória concomitante com o subtipo D_{2S} (SOKOLOFF *et al.*, 2006). Já os receptores do subtipo D₄ possuem 3 regiões não codificadoras (MISSALE *et al.*, 1998) e limitado padrão de distribuição e funcionalização em relação aos subtipos do mesmo grupo (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011). Sua distribuição se estende nas regiões da amígdala, hipocampo, hipotálamo, globo pálido e tálamo, predominantemente em neurônios pós-sinápticos nos eixos dendríticos e espinhas/estriatais, projetando-se de volta a substância nigra modulando a secreção de dopamina (RIVERA *et al.*, 2002; RONDOU; HAEGEMAN; VAN CRAENENBROECK, 2010). A funcionalização desse subtipo ainda é pouco compreendida, relacionado pobremente aos fenômenos de alvos antipsicóticos e controle motor de acordo a expressão mínima no córtex primário (MISSALE *et al.*, 1998; BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011; RONDOU; HAEGEMAN; VAN CRAENENBROECK, 2010; RIVERA *et al.*, 2002).

1.1.5 Desenvolvimento do sistema dopaminérgico

Glucksmann (1951), foi pioneiro em discutir a formação dos tecidos nos vertebrados, abordando os fenômenos de proliferação celular, migração e os locais de geração de zonas ativas e a agregação com outros tipos celulares, capazes de gerar a estrutura anatômica bruta de formação do encéfalo (GLÜCKSMANN, 1951). Em mamíferos, os principais neurônios corticais originam da zona ventricular proliferativa e do telencéfalo dorsal e migram em direção ao córtex para a formação da placa cortical (RAKIC, 1974, p. 1). Em seguida, ocorre uma regressão seletiva de morte celular mediada por secreção, transcrição gênica, substratos de adesão e fatores ambientais externos que compõem a estrutura morfológica neuronal, determinação de áreas de atividade e os mecanismos de transmissão simpática (PURVES, D.; LICHTMAN, 1980). Esse importante mecanismo de formação acontece em decorrência do balanço excitatório e inibitório de diversos neurotransmissores que são liberados durante o período de formação do cérebro (COWAN *et al.*, 1984; MOUNTCASTLE, 1997). Durante o período de desenvolvimento do cérebro,

neurônios dopaminérgicos, bem como seus receptores, podem ser identificados em idades e áreas distintas de formação em diversos modelos experimentais (LA MANNO *et al.*, 2016). Em camundongos, os neurônios dopaminérgicos nascem aproximadamente no estágio embrionário E10.5 no assoalho basal do mesencéfalo a partir da transcrição por Lmx1a (PRAKASH; WURST, 2006). Ao passo que o cérebro avança no desenvolvimento, a distribuição circunscrita dos neurônios surge em outros locais a partir de migração e proliferação (POPOLO; MCCARTHY; BHIDE, 2004). No E13 e E15 é possível observar neurônios dopaminérgicos em camundongos no prosencéfalo, telencéfalo basal (neocórtex) e áreas neocorticais (córtex pré-frontal) respectivamente. Ainda nessa fase, é possível observar também, o desenvolvimento das projeções axonais crescendo em ponta (POPOLO; MCCARTHY; BHIDE, 2004). Nesse período embrionário, a liberação de dopamina e a atividade dos seus receptores atuam na proliferação e diferenciação celular e permite a comunicação entre a eminência ganglionar lateral e o telencéfalo (OHTANI *et al.*, 2003). Além disso, neurônios dopaminérgicos também estão presentes no prosencéfalo no E12, E13, E14 e E15 em camundongos (OHTANI *et al.*, 2003).

1.1.6 Funções da sinalização dopaminérgica no desenvolvimento

A dopamina tem papel fundamental durante a formação do cérebro, ao passo que sua síntese e liberação está presente nos estágios iniciais de desenvolvimento (TODD, 1992). Lankford e colaboradores (1988) demonstraram a influência da dopamina sobre a redução na motilidade e crescimento de neuritos em células da retina de galinha *in vitro* (*Gallus domesticus*) no E8, a partir da estimulação dos receptores do tipo-D1, evidenciado pelo aumento de cAMP e o imageamento micrográfico. Além disso, foi demonstrado também que a inibição por haloperidol (inibidor inespecífico receptores tipo-D2) e (-) SCH-23390 (inibidor receptor tipo-D1) recuperou o efeito nos neuritos (LANKFORD; DEMELLO; KLEIN, 1988). Em sintonia com esse fenômeno demonstrado pela estimulação dos receptores tipo-D1, há também evidências de que a ativação oposta aos receptores tipo-D2 ampliam esse crescimento e contribuem para a ramificação celular (TODD, 1992). A estimulação com (-) cloridrato-quinpirole para receptores tipo-D2, em fatias do córtex pré-frontal de camundongos no E17 e E18, demonstrou um aumento no crescimento e ramificação de neuritos. Além disso, foi discutido também que esse crescimento pode ser atribuído

a isoforma D_{2L}, uma vez que ela foi identificada em maior quantidade nas regiões do pré-frontal (TODD, 1992). Neurônios dopaminérgicos, bem como seus receptores, estão presentes em quantidades consideráveis nos gânglios basais e nascem aproximadamente no E12 no neocórtex de camundongos (OHTANI *et al.*, 2003; ANDERSON *et al.*, 1997) O estímulo 24/48h com agonista seletivo para a família tipo-D2 (SKF-81297) em fatias do telencéfalo de camundongos entre eminência ganglionar medial e lateral no E15 demonstrou a predominância de migração de neurônios GABAérgicos para a parede cerebral, enquanto a estimulação de receptores tipo-D2 com (-) cloridrato-quinpirole reduziu (CRANDALL *et al.*, 2007). Igualmente, a estimulação com dopamina + SCH-23390 também reduziu a migração desses grupos neuronais, uma vez que o possível input de dopamina aumentou para classe de receptores oposta. Nesse mesmo experimento, o estímulo dos receptores tipo-D2 via eticloprida + dopamina exerceu o mesmo efeito na migração de neurônios GABAérgicos quando comparados com o agonista dos receptores tipo-D1 (CRANDALL *et al.*, 2007). Em modelos *in vivo*, também é possível observar a participação da dopamina e seus receptores no neurodesenvolvimento.

A abordagem experimental em modelos *knockout*, tanto para a família D₁ quanto D₂, manteve a participação dicotômica de ambas classes, uma vez que os animais transgênicos *knockout* para tipo-D1 reduziu a migração de neurônios GABAérgicos e o grupo *knockout* para tipo-D2 quando tratados com agonistas, antagonistas e dopamina (OHTANI *et al.*, 2003; POPOLO; MCCARTHY; BHIDE, 2004; ARAKI *et al.*, 2006CR; ANDALL *et al.*, 2007). Além disso, nosso grupo, utilizando larva de zebrafish como modelo experimental, demonstrou redução no número de neurônios GABAérgicos quando tratadas com dopamina e (-) cloridrato-quinpirole entre 3 dpf e 5 dpf, quando tratadas com inibidor de Akt que compõem a via intracelular mediada pela ativação dos receptores tipo-D2 (SOUZA; ROMANO-SILVA; TROPEPE, 2011). Nosso grupo também demonstrou que a redução da expressão da DARPP-32 por injeção de morpholinos também diminui o número de neurônios GABAérgicos nas larvas de zebrafish (Souza *et al.*, submetido). Em ambos os estudos também foi observado a redução do comportamento motor.

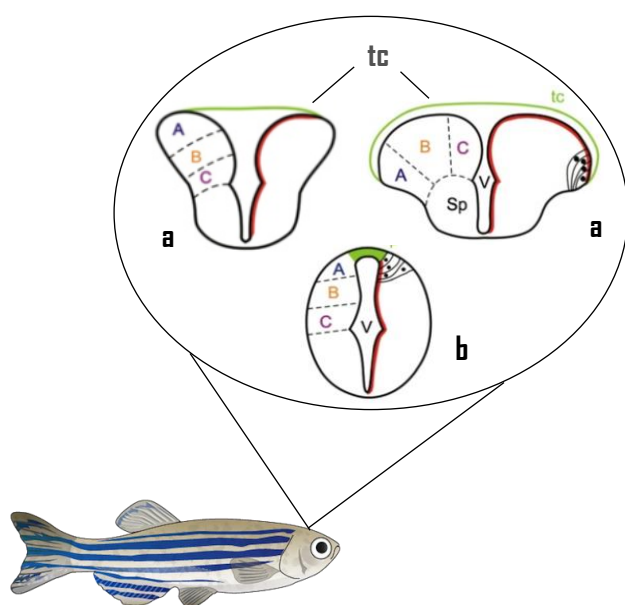
Outras evidências consistentes sobre o mecanismo intracelular mediada pela família tipo-D1 no desenvolvimento também são sustentadas (FRIEDMAN; YADIN;

WANG, 1996). Em um estudo realizado em coelhos tratados com cocaína entre o estágio embrionário de 8 a 29 dias, e avaliado as fatias do córtex pré-frontal e giro do cíngulo com 10-100 dias de vida, foi observado que houve uma redução da ligação da dopamina nos receptores tipo-D1 a medida que o cérebro avançava no desenvolvimento, evidenciado pela atividade de GTPγS (guanosina 5'-O- gama-tio trifosfato), um análogo a proteína Gα, o principal sítio de ativação transmembrana mediado pela família D1 (FRIEDMAN; YADIN; WANG, 1996). Como base nesses achados, é fundamental ampliar o conhecimento da participação da dopamina durante a fase desenvolvimental, sobre tudo com o uso de novos modelos experimentais que apresentem características aplicadas para essas investigações.

2 ZEBRAFISH (*Danio rerio*) COMO MODELO EXPERIMENTAL

Todos os modelos experimentais têm vantagens e desvantagens, por isso, modelos experimentais diversos para abordagens desenvolvimentais e a relação com

Figura 4 - Anatomia do encéfalo de osteíctes



Visão geral do encéfalo de osteíctes; a. Visão lateral do Palio representado nas estruturas A, B e C e Subpalium (sp), ambas estruturas se esticam lateralmente para formar a tela coroide (tc). Células ventriculares dispostas na região do Palio e Subpalium em vermelho. b. Visão dorsal do encéfalo evertido. V (ventrículo). Adaptado (FOLGUEIRA *et al.*, 2012).

o sistema dopaminérgico são requeridos. Sendo assim, o teleósteo zebrafish (*Danio rerio*) contém uma grande contribuição para investigações dessa esfera, uma vez que a descrição dos neurônios dopaminérgicos e sua funcionalização estão presentes em estágios iniciais de desenvolvimento (SCHWEITZER; DRIEVER, 2009).

A utilização do zebrafish como modelo experimental vem aumentando consideravelmente nas últimas décadas, devido ao seu genoma bem caracterizado compondo 70% de equivalência genética com humanos (HOWE *et al.*, 2013). Outras vantagens podem ser observadas no modelo, como o

baixo custo de manutenção, facilidade no manuseio, alta taxa de reprodução e fertilidade (GRUNWALD; EISEN, 2002). A arquitetura do cérebro do zebrafish é composta por 2 hemisférios principais; Subpallium (estriado, pallium e domínio pálio-septal) e pálio (estruturas corticais) (GANZ *et al.*, 2012). A estrutura bruta se apresenta de forma evertida separada por um ventrículo único (Fig. 4) (FOLGUEIRA *et al.*, 2012), além disso, regiões conservadas evolutivamente, tais como, bulbo olfatório, retina, cerebelo e corda espinal são preservados no zebrafish (FRIEDRICH; JACOBSON; ZHU, 2010).

O ciclo de vida do zebrafish apresenta vários estágios distintos de desenvolvimento; 0-72 horas pós-fertilização (hpf) pré-incubação no estágio embrionário, 72-120 dpf no estágio larval e entre 30-89 dpf na fase juvenil, atingindo a maturidade sexual em 90 dpf (SPENCE *et al.*, 2008). Diversos comportamentos podem ser avaliados desde a fase embrionária até a fase adulta, tais como tipo-ansiedade (MAXIMINO *et al.*, 2010, LIMA *et al.*, 2020), interação social (MILLER; GERLAI, 2007), tipo-depressivo (ZIV *et al.*, 2013) adição (COLLIER; ECHEVARRIA, 2013), memória (YU *et al.*, 2006) e controle motor (SOUZA; ROMANO-SILVA; TROPEPE, 2011). O desenvolvimento do comportamento motor no zebrafish inicia aproximadamente a 17 hpf via transmissão sináptica *gap junction* ainda no córion, através de movimentos de cauda, e se tornam mais robustos a medida que as larvas avançam no desenvolvimento (SAINT-AMANT; DRAPEAU, 2000). Sendo assim, várias investigações que utilizam a larva de zebrafish como modelo experimental se concentram em alterações de comportamento motor ainda nos estágios iniciais.

Somado a isso, outros comportamentos também são estudados no zebrafish ainda em estágios iniciais. Sabe-se que a 5 dpf, a larva de zebrafish apresenta resposta de sobressalto, caça, interação social, resposta de fuga e ansiedade a partir de estímulos luminosos e locais de preferência. É sabido que, mesmo antes da formação completa do sistema visual conectada ao encéfalo, é possível que as células contendo opsinas na medula espinal respondam a estímulos luminosos inibindo movimentos espontâneos (FRIEDMANN *et al.*, 2015). Além disso, à medida que os animais avançam no desenvolvimento, ocorre uma mudança na transição de respostas durante o estímulo luminoso em várias etapas de controle motor (BASNET *et al.*, 2019). Larvas com 5dpf apresentam uma resposta estereotipada durante a

mudança repentina de claro para escuro, exibindo um aumento na locomoção e reduzindo vagarosamente (BURGESS; GRANATO, 2007). Ainda assim, é sabido que o zebrafish é de hábito diurno, o que compõe um aumento da locomoção durante o dia e à medida que os animais avançam no desenvolvimento a locomoção se torne ainda mais evidente (BURGESS, Harold A.; SCHOCH; GRANATO, 2010).

2.1 SISTEMA CATECOLAMINÉRGICO NO ZEBRAFISH

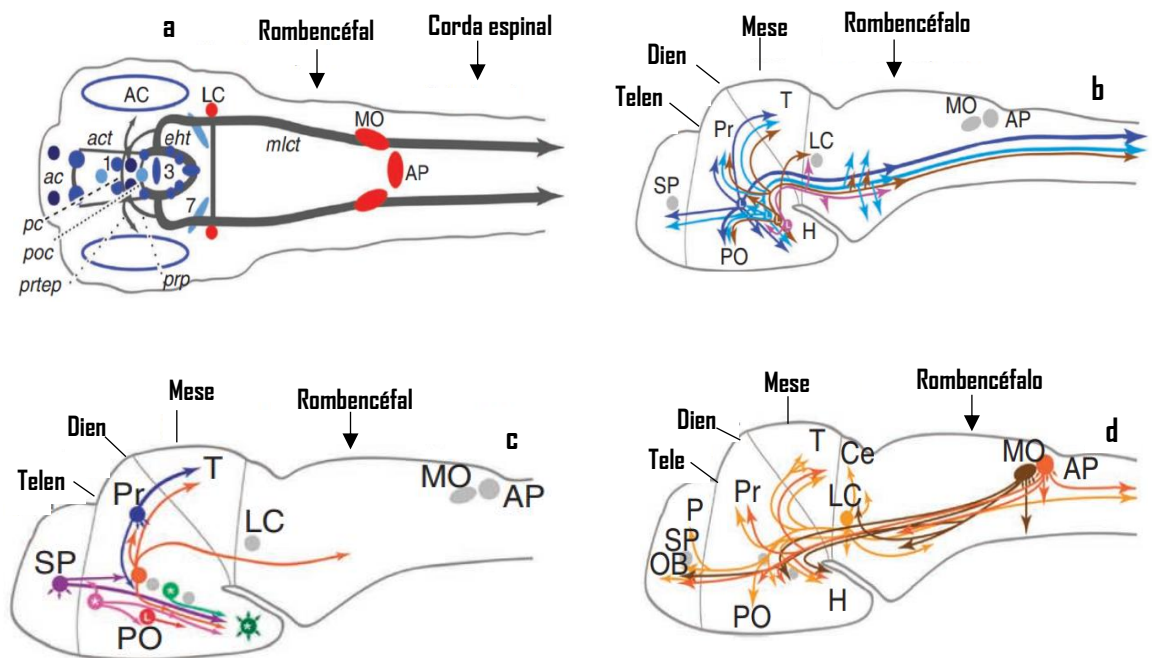
O início da formação dos circuitos dopaminérgicos já pode ser identificado a partir de 18 hpf no diencéfalo ventral (DC) dentro do tubérculo posterior e com 4 dpf a maioria da maquinaria neural já está presente (KIMMEL *et al.*, 1995; KUWADA, 1995).

As primeiras identificações se desenvolveram a partir da descrição dos substratos TH para a identificação de neurônios dopaminérgicos e dopamina- β -hidroxilas (D β H) para síntese de neurônios noradrenérgicos (MA, 1997), essa abordagem se concentra em regiões anatômicas de expressão gênica que torna possível a correlação com mamíferos, uma vez que genes ortólogos inerentes a esses substratos são sustentados em ambos modelos experimentais (RINK, ELKE; WULLIMANN, 2002; HOWE *et al.*, 2013).

De acordo com o projectoma neural do zebrafish em 4 dpf é possível observar os grupamentos neuronais e suas ramificações. A projeção mais extensa observada origina do tubérculo posterior interligando o diencefaloespinal descendente à porção endohipotalâmica. Há também neurônios presentes em quantidades maciças na porção subpalial que conecta o DC e se consolida como a principal via de projeção dopaminérgica (TAY *et al.*, 2011). Uma descrição mais detalhada do circuito catecolaminérgico no zebrafish é possível de acordo com a marcação da maquinaria enzimática presente no estágio inicial de desenvolvimento em 4 dpf (SCHWEITZER; DRIEVER, 2009). Sendo assim, grupamentos catecolaminérgicos do tipo noradrenalina estão presentes no locus coeruleus (LC), medula oblonga vagal (MO) e área postrema (AP) (TAY *et al.*, 2011). Uma segunda estrutura de ramificação de neurônios dopaminérgicos, originados do DC 1, projetam localmente e de forma mais intermediária do tálamo posterior e periventriculares e os neurônios dopaminérgicos pré-retal. Outro grupo descrito DC 3 e DC 7, envia suas projeções mais localmente em regiões da retina (pre-óptica) e olfativa. Já os grupos neuronais DC 2, DC 4, DC 5

e DC 6 possuem um perfil de projeção mais disperso, atingindo distintas áreas anteriores e posteriores do rombencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, telencéfalo e corda espinal (Fig. 5). Finalmente os grupos de neurônios no Subpalium projetam para regiões do hipotálamo (TAY *et al.*, 2011; RINK, ELKE; WULLIMANN, 2002; MA, 1997; SCHWEITZER; DRIEVER, 2009; FRIEDRICH; JACOBSON; ZHU, 2010).

Figura 5 - Visão do catecolaminérgico no zebrafish



Esquema representativo do sistema catecolaminérgico na larva de zebrafish 4 dpf. **a.** Visão ventral dos neurônios DA (azul escuro) e dorsal (azul claro). Grupos DC1 (tubérculo paraventricular posterior), DC3 (hipotálamo medial), DC7 (hipotálamo caudal) células amácrinas retinais. **b.** Projeções DA DC2 (azul escuro), DC4 (azul claro), DC5 (marrom) e DC6 (roxo), as setas indicam a áreas de projeção em direção ao telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, rombencéfalo e corda espinal, visão lateral. **c.** Projeções locais e intermediárias dos grupos DA subpaliais (roxo), neurônios pré-tectais (azul escuro), neurônios DC1 (laranja) em direção ao telencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo, neurônios da área pré-óptica anterior (roxo claro), grupamento de neurônios DC3 e DC7 (verde e verde claro), visão lateral. Projeções noradrenérgicas em distintas regiões do telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, rombencéfalo e medula espinal, visão lateral. Células amácrinas retinais (AC), trato anterior (act), trato endohipotalâmico (eht), trato medial longitudinal (mlct), comissura posterior (pc), comissura pós-óptica (poc), projeções pré-tectais (prp), projeções pretectotectal (prtep), medula oblonga (MO), bulbo olfatório (OB), locus coeruleus (LC), área postrema (AP), cerebelo (Ce), pallium (P), Subpalium (sp), hipotálamo (H), pré-tectum (Pr), região pré-óptica (PO), tectum (T), telencefalo (Telen), diencéfalo (Dien), mesencéfalo (Mese). Adaptado (TAY *et al.*, 2011).

Interessantemente, não existem neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo do zebrafish. De fato, isso compõem a grande diferença entre mamíferos, uma vez que a principal fonte de neurônios dopaminérgicos se concentra na região A9 e A10 no mesencéfalo de mamíferos. Contudo, regiões do DC e tubérculo posterior enviam suas projeções para o Subpallium, e tem sido sugerida como componente modulatório mesencefálico em mamíferos (RINK, E.; WULLIMANN, 2001). Outra importante correlação é a projeção subpallial correspondente ao estriado de mamíferos (RINK, E.; WULLIMANN, 2001). Além disso, os grupos neuronais no DC2, DC4, DC5 e DC6, são similares aos neurônios da A11, bem como os grupos hipotalâmicos A12, A13, A14 e A15 no tálamo ventral entre outras correlações (Tab.1) (TAY *et al.*, 2011).

Tabela 1. Correlação do circuito catecolaminérgico entre zebrafish e mamíferos; Continua

Grupos neuronais	Zebrafish	Mamíferos	Projeção	Ref.
DA	Inexistente	A 9, A 10	Núcleo Accumbens; Estriado; Regiões límbicas;	(TAY <i>et al.</i> , 2011) (RINK, ELKE; WULLIMANN, 2002; BJÖRKLUND; DUNNETT, 2007)
NA	Medula oblonga; locus coeruleus; Área postrema;	A1, A2, A3	Medula oblonga; Prosencéfalo; Hipotálamo;	(SMEETS; GONZÁLEZ, 2000; TAY <i>et al.</i> , 2011)
NA	Locus coeruleus	Locus coeruleus	Corda espinal; Cerebelo; Hipotálamo; Tálamo; Hipocampo; Estriado; Neocórtex;	(ORDWAY; SCHWARTZ; FRAZER, 2012; TAY <i>et al.</i> , 2011)
DA	DC 2, DC 4, DC 5 e DC 6	A11	Projeções diencefálicas	(SKAGERBERG; LINDVALL, 1985; TAY <i>et al.</i> , 2011)

Tabela 1 - Correlação do circuito catecolaminérgico entre zebrafish e mamíferos; conclusão

Grupos neuronais	Zebrafish	Mamíferos	Projeção	Ref.
DA	DC 0, DC 1	A 13	Tálamo ventral	(DUBACH <i>et al.</i> , 1987; RINK, ELKE; WULLIMANN, 2002)
DA	DC 3, DC 7, DC 8	A12, A14	Projeções Hipotalâmicas	(BETARBET <i>et al.</i> , 1997; TAY <i>et al.</i> , 2011)
DA	Grupos pre-ópticos Área anterior	A 15	Área pré-óptica	(TAY <i>et al.</i> , 2011; TASHIRO <i>et al.</i> , 1989)
DA	Bulbo olfatório	A 16	-	(TAY <i>et al.</i> , 2011; BJÖRKLUND; DUNNETT, 2007)
DA	Células amácrinas retiniais	A 17	Retina	(SCHWEITZER; DRIEVER, 2009; BJÖRKLUND; DUNNETT, 2007)

Tabela 1. Correlação entre zebrafish e mamíferos; Neurônios dopaminérgicos (DA); Neurônios noradrenérgicos (NA); Área (A); Diencéfalo ventral (DC). Os números representam os grupamentos de células nas regiões descritas.

A respeito do complexo enzimático, sabe-se hoje que duas famílias de TH (*th1* - *th2*) são identificadas no zebrafish em fases e regiões distintas. Esse conhecimento, advém da duplicação gênica observada em teleosteo durante o processo evolutivo (CANDY; COLLET, 2005). A partir 8 dpf é possível identificar mais precisamente a expressão em grupamentos neuronais. Em 24 hpf a *th1* se encontra no locus coeruleus, e em 72 hpf, se apresenta em grandes quantidades na região pré-óptica ventral e dorso caudal (grupos neuronais 3, 3b, 4), telencéfalo e bulbo olfatório (grupos neuronais 1, 2), pre tectum (grupo neuronal 7) e tubérculo posterior (grupo neuronal 11). Em 48 hpf a *th1* se encontra no diencéfalo (grupos neuronais 5, 6, 11), região

paraventricular anterior (grupos neuronais 8, 8b), hipotálamo (grupo neuronal 13), lobo caudal e formação reticular interna (grupos neuronais 15, 16) e em 120 hpf na região paraventricular interna (grupos neuronais 9, 9b). A *th2* pode ser identificada a partir de 24 hpf na região paraventricular anterior (grupos neuronais 10, 10b) e em estágios mais tardios a partir de 96 hpf, na região paraventricular anterior (grupos 8, 8b), região paraventricular interna (grupos neuronais 9, 9b) e área pré-óptica (grupos neuronais 3, 3b, 4) (CHEN; PRIYADARSHINI; PANULA, 2010). Contudo, na idade de 4 dpf ambas enzimas estão presentes no zebrafish (CHEN; PRIYADARSHINI; PANULA, 2009), compondo o complexo enzimático essencial para a síntese e liberação de dopamina atuando sobre os receptores dopaminérgicos (SCHWEITZER; DRIEVER, 2009).

2.1.2 Evolução dos receptores dopaminérgicos no zebrafish

Uma classe multivariada de receptores dopaminérgicos é amplamente distribuída em osteíctes (zebrafish) (YAMAMOTO *et al.*, 2015). De acordo com a terminologia já descrita para humanos tipo-D1 (D₁ e D₅), um terceiro subgrupo foi identificado em anfíbio (*Xenopus laevis*) descrito como D_{1C} em seguida, enguia (*Anguilla anguilla*), carpa (*Cyprinus carpio*) e tilápia (*Oreochromis mossambicus*) (SUGAMORI *et al.*, 1994; KUBIKOVA; WADA; JARVIS, 2010). Porém, essa subclasse possui uma diferença farmacológica em relação a estabilidade e dessensibilização, apesar de apresentar em sua estrutura genômica introns e a habilidade de ampliar a cascata mediada por ativação de AC (SUGAMORI *et al.*, 1994).

Outra subclasse descrita como D_{1D} foi identificada em genoma de galinha (*Gallus gallus domesticus*) (DEMCHYSHYN *et al.*, 1995) e posteriormente em zebra finch (*Taeniopygia guttata*) e foi sugerida como uma subclasse específica para pássaros, ao passo que não apresenta farmacologia e perfil de ativação semelhante aos receptores tipo D_{1C} de *Xenopus* e teleósteo (KUBIKOVA; WADA; JARVIS, 2010).

Estudos subsequentes reorganizaram a terminologia e descreveram ambos receptores D_{1C} e D_{1D} como ortólogos, pertencentes a um ancestral comum, e foram renomeados como receptores D_{1C} de acordo com a classificação filogenética (YAMAMOTO *et al.*, 2013). Além disso, outro receptor identificado em retina de carpa, que apresenta uma sequência de aminoácidos não encontrada em outros receptores

dessa mesma classe, foi apresentado como receptor D1_x (HIRANO; ARCHER; DJAMGOZ, 1998) e posteriormente se tornou compilando ao processo parálogo em relação aos receptores D1_B, devido alterações genômicas do processo evolutivo de teleósteo (YAMAMOTO *et al.*, 2013). Baseado nessa descrição, o receptor inicialmente denominado D1_x, foi renomeado em D1_{Bb} enquanto os receptores D1_B recebeu a nomenclatura de D1_{Ba} (YAMAMOTO *et al.*, 2013).

O sequenciamento do genoma de tubarão elefante (*Callorhynchus milii*) permitiu uma descrição mais detalhada da evolução dos receptores tipo-D1 em peixes cartilaginosos e ósseos. Sendo assim, três genes de receptores do tipo-D1 foram encontrados em tubarão elefante pertencentes aos subtipos D1_a, D1_b, D1_c. Além disso, quatro genes encontrados em osteíctes, gerou a hipótese de que existiu um ancestral gnostomado comum, entre peixe ósseo e peixe cartilaginoso (VENKATESH *et al.*, 2014). Novamente os receptores do tipo-D1 sofreu outra descrição, nomeados da seguinte forma; D1_A, D1_B, D1_C e D1_E. Portanto, seguindo a nomenclatura anteriormente descrita, para evitar qualquer confusão entre outros subtipos (YAMAMOTO *et al.*, 2015).

Quanto a classe oposta, os receptores do tipo-D2 em zebrafish, foram inicialmente descritos como; tipo-D2 (D_{2a}, D_{2b} e D_{2c}) e D₄ (D_{4a}, D_{4b} e D_{4c}) seguindo a descrição genômica de três genes para cada receptor (BOEHMLER, WENDY *et al.*, 2004; BOEHMLER, W. *et al.*, 2007). Porém, essa nomenclatura foi renomeada descrevendo o receptor D_{2b} como D_{2l} (D_{2like}), de acordo com a base de dados (*Ensembl genome browser 98*) e ZFIN (*The Zebrafish Information Network*) baseado na sequência proteica oposta desse receptor em relação a outros dois receptores que contêm genes parálogos, e então, os receptores D_{2c} foram renomeado como D_{2b}. Assim, os receptores D_{4b} foram renomeados como Sequência-relacionada (D_{4rs}) e por fim os receptores D_{4c} foram descritos como D_{4b}, de acordo com a sequência proteica encontrada em diversos vertebrados (YAMAMOTO *et al.*, 2015). Somado a isso, genes que ampliam a descrição para os receptores D_{4rs} e D_{2l}, ao passo que estão presentes em celacanto, tilápia, e gar, além do gênero *Danio spp.* e em outras linhagens de vertebrados (OPAZO *et al.*, 2018), gerou a relação de que ambos receptores não são específicos para osteíctes e pertencem a um ancestral comum (YAMAMOTO *et al.*, 2015; OPAZO *et al.*, 2018; FILIPPI *et al.*, 2010).

No intuito de produzir clareza em relação aos receptores em osteíctes, a descrição atual para ambas famílias de receptores em zebrafish são da seguinte forma; receptores do tipo-D1 - subtipos, (D₁, D₅, D₆ e D₇), e receptores tipo-D2 - (D₂, D₃, D₄, D₈, D₉), de acordo com a prevalência genômica de quatro genes para os receptores do tipo-D1 e cinco genes para os receptores do tipo-D2, consolidando nove receptores em zebrafish. Apesar dessa nomenclatura não ser clara quanto sua classificação, a fisiologia e farmacologia de ambas famílias são preservadas evolutivamente em processos ortólogos e parálogos, tendo em si, um ancestral comum (YAMAMOTO *et al.*, 2013; YAMAMOTO *et al.*, 2015; OPAZO *et al.*, 2018).

3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Estima-se que em 2030 os gastos com os impactos causados por transtornos mentais possam atingir cerca de \$6.000.000.000 trilhões de dólares (BLOOM *et al.*, 2017). Além disso, os prejuízos também se somam a problemas sociais gerando complicados de interação e relacionamentos. Inúmeros transtornos psiquiátricos contêm sintomatologia multifuncional e com teor altamente debilitante, e evidências sustentam hipóteses de alterações dopaminérgicas e desenvolvimental relacionadas à diversos transtornos. Entretanto, durante a fase desenvolvimental do cérebro, pouco se sabe quais são os fatores que podem contribuir para o surgimento dessas patologias, sobretudo a participação da dopamina e o seu papel de sinalização nos estágios iniciais. A compreensão mais detalhada dos mecanismos moleculares da dopamina durante os estágios iniciais de desenvolvimento poderá acarretar na clareza a respeito dos transtornos neuropsiquiátricos que tem relação com o desbalanço desse neurotransmissor e criará meios e ferramentas para auxiliar na prevenção, diagnóstico e tratamento. Por fim, essa pesquisa busca compreender os pontos críticos do papel da dopamina em fases iniciais de desenvolvimento, no comportamento motor, utilizando a larva de zebrafish como modelo experimental.

4 HIPOTESE

A exposição crônica com dopamina, agonistas e antagonistas dopaminérgicos durante a janela desenvolvimental de 3 - 5 dpf, alteram o comportamento motor de larvas de zebrafish.

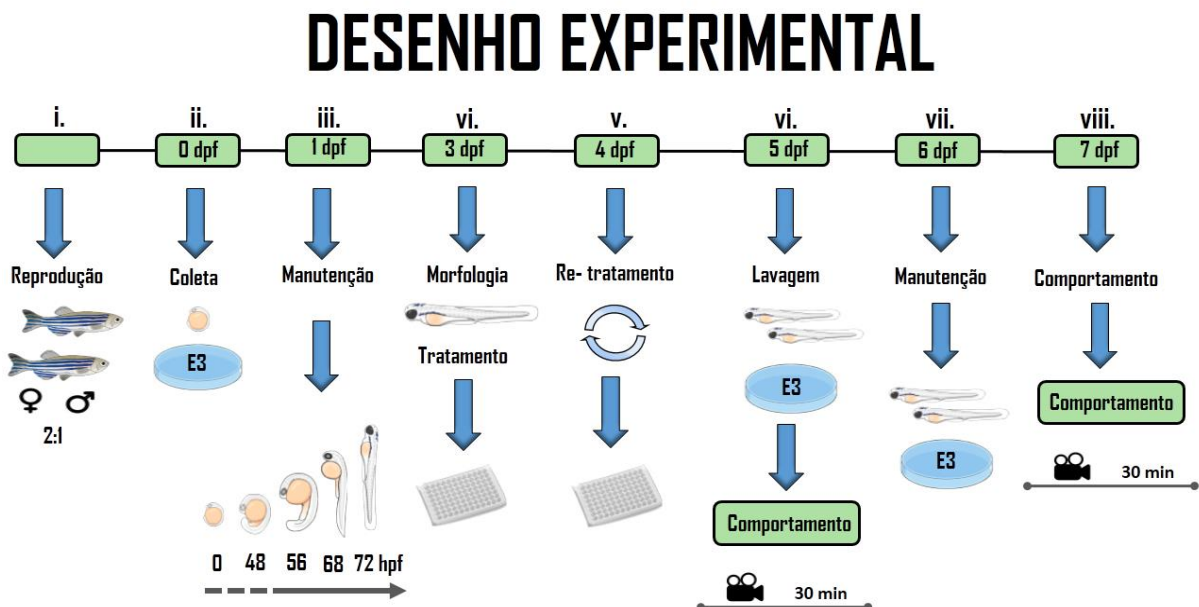
5 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel dos receptores dopaminérgicos, na janela desenvolvimental 3-5 dpf, no desenvolvimento do comportamento motor de larvas de zebrafish. Investigar se estas alterações são mantidas até o 7 dpf e se os efeitos são diferentes no ambiente claro e escuro.

5.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Verificar se larvas de zebrafish expostas à dopamina, entre 3 e 5 dpf, apresentam alterações no comportamento motor em 5 e 7 dpf no claro e no escuro;
- 2) Verificar se larvas de zebrafish expostas ao SKF-38393 (agonista de D1) ou ao SCH-23390 (antagonista de D1), entre 3 e 5 dpf, apresentam alterações no comportamento motor em 5 e 7 dpf no claro e no escuro;
- 3) Verificar se larvas de zebrafish expostas ao Quinpirole (agonista de D2) ou ao Eticloprida (antagonista de D2), entre 3 e 5 dpf, apresentam alterações no comportamento motor em 5 e 7 dpf no claro e no escuro;

Figura 6 - Desenho experimental



5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CUIDADOS GERAIS COM AS MATRIZES

Zebrafish adultos foram mantidos em aquários de 10 litros (número de animais/área: 1 animal por litro) alimentados com ração floculada duas vezes ao dia e artêmia salina. O biotério aquático do ICB- FURG apresenta um ciclo de claro/escuro de 12/12 h. O biotério foi mantido a temperatura 28 °C com Ph entre 7.0 a 7.3. Os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética e uso de animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG - protocolo 16/2019) e da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/FURG – protocolo P003/2019).

5.1.1 Reprodução i.

As reproduções iniciavam às 17h, 1h após alimentação, com intervalo de 48 horas entre as reproduções obedecendo o repouso dos animais. As matrizes de reprodução, eram escolhidas de acordo com as condições ideais de fertilidade com idade superior a 1 (um) ano, não apresentando cegueira, edemas, hematomas, hemorragia e curvatura corporal anormal. Em seguida, as matrizes foram dispostas em aquários específicos para reprodução, ainda no biotério aquático, contendo água do sistema com Ph entre 7.0 a 7.3, temperatura 28 °C na proporção de 2 (dois) machos para 1 (uma) fêmea (2:1), contendo armadilhas especializadas para captura e proteção dos ovos. No dia seguinte, às ±10h am, os casais foram devolvidos para os aquários matrizes e ovos depositados foram coletados.

5.1.2 Coleta da desova e manutenção dos embriões ii.

Após a transferência dos animais matrizes para seus aquários matrizes, os ovos depositados pelas fêmeas, foram coletados ainda no matutino através de um filtro de material flexível e lavados com água do sistema por 3 vezes para retirada de dejetos, em seguida os ovos foram dispostos em uma placa de petri transparente com 3 ml de água do sistema em um fundo escuro para facilitar a identificação. Utilizando um estereomicroscópio, os ovos foram contados e retirados os ovos não fertilizados para um futuro descarte. Os ovos fecundados foram colocados em uma nova placa de petri

na quantidade máxima de 60 ovos por placa, contendo 3 ml de meio de embrião (E3) (5mM de NaCl, 0,17 mM de KCl, 0,33 mM de CaCl₂ e 0,33 mM de MgSO₄) para garantir o desenvolvimento sadio, contendo azul de metileno a 1% (10 µl: 1.000 ml de E3) com pH ideal entre 7.0 e 7.3 e mantidos em uma estufa com demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D) a 28^oC, ciclo 12:12 por até 48 hpf. Após 48 hpf, o E3 era renovado, retirados os ovos não fertilizados e os embriões inviáveis. Em seguida, era feita uma nova contagem para avaliar a qualidade da desova, bem como as matrizes utilizadas para reprodução, e retirada dos ovos e embriões inviáveis.

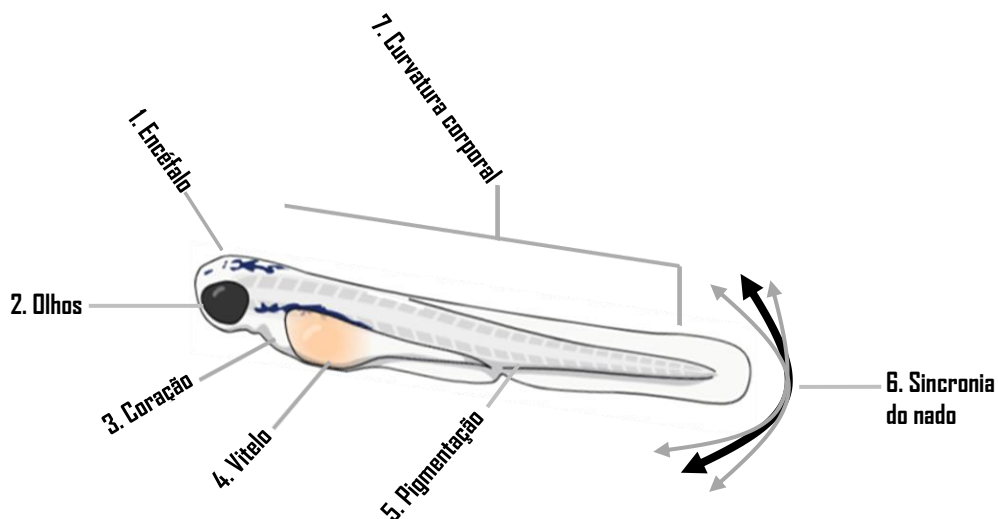
5.1.3 Manutenção das larvas iii.

As manutenções das larvas foram realizadas diariamente entre a eclosão que decorria entre 48 e 72 hpf. O E3 era renovado com ph ideal, sem azul de metileno, e os animais eram mantidos na B.O.D a 28^oC com ciclo 12:12 até o início da análise morfológica e tratamentos.

5.1.4 Análises morfológicas iv.

As análises morfológicas das larvas foram realizadas na idade de 3 dpf. As larvas foram colocadas em uma placa de petri na quantidade de 10 larvas com 3 ml de E3, ph ideal 7.0 a 7.3, sem azul de metileno. Através de um estereoscópio, foram observadas as seguintes condições de bem-estar dos animais de acordo (*OECD. Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment mixtures. Environment Directorate. Paris; OECD; 2000; Zebrafish Information Network* (Fig. 7).

Figura 7 - Representação da larva de zebrafish em 3 dpf



Esquema ilustrativo das análises morfológicas qualitativas avaliados na larva de zebrafish em 3 dpf.

1. Encéfalo; foram observadas malformações no encéfalo;
2. Olhos; foram observados tamanho dos olhos e coloração anormal;
3. Coração; foram observados edemas e hemorragias;
4. Vitelo; foram observados, edemas e lesões;
5. Pigmentação; foram observados pigmentação anormal e distribuição de melanocitos;
6. Sincronia do nado; durante observações de 5 min, foram observados nados em abas direções da placa e ausência de nado em espiral sem deslocamento;
7. Curvatura corporal; foram observado curvatura corporal anormal e ausência de locomoção e tamanho de 3 mm;

5.1.5 Exposição crônica e fármacos utilizados

Os fármacos utilizados foram adquiridos pela Sigma Aldrich e as informações detalhadas sobre afinidade ao receptor, concentrações, código e descrição dos grupos estão disponíveis na tabela 2. As concentrações foram estabelecidas de acordo com (SOUZA; ROMANO-SILVA; TROPEPE, 2011). Os tratamentos crônicos

tiveram duração de 2 (dois) dias e as soluções de trabalho foram preparadas a fresco diante de cada tratamento em local com pouca iluminação para evitar oxidação fotossensível das drogas. A troca das drogas foram realizadas a cada 24 horas no mesmo horário de início do primeiro dia. O início dos tratamentos ocorreu às 13h e foram realizados em uma placa 96 poços (semi skirted PCR, branca) no volume final de 200ul para os grupos tratados e 200 ul de E3 pH ideal para os grupos controle. As larvas foram expostas as soluções manuseadas gentilmente com uma pipeta de Pasteur, alocando uma larva em cada poço. Posteriormente, as placas foram envolvidas em papel alumínio, para evitar o contato luminoso e armazenadas na B.O.D a 28^oC com ciclo claro/escuro de 12:12. No segundo dia, as placas foram retiradas gentilmente da estufa para evitar atritos e quedas e o tratamento refeito nas mesmas condições do primeiro dia.

Tabela 2. Informações das exposições e fármacos utilizados; continua

Fármacos utilizados	Código	Concentração []	Receptores	Grupos
E3	–	–	–	CRTL
DOPAMINA	H8502	100µm	Ago. tipo D ₁ / D ₂	DA
SKF – 38393	D047	10µm	Ago. subtipo D ₁	SKF
QUINPIROLE	Q102	10µm	Ago. subtipo D ₂	QUIN

Tabela 2. Informações dos tratamentos e fármacos utilizados; conclusão

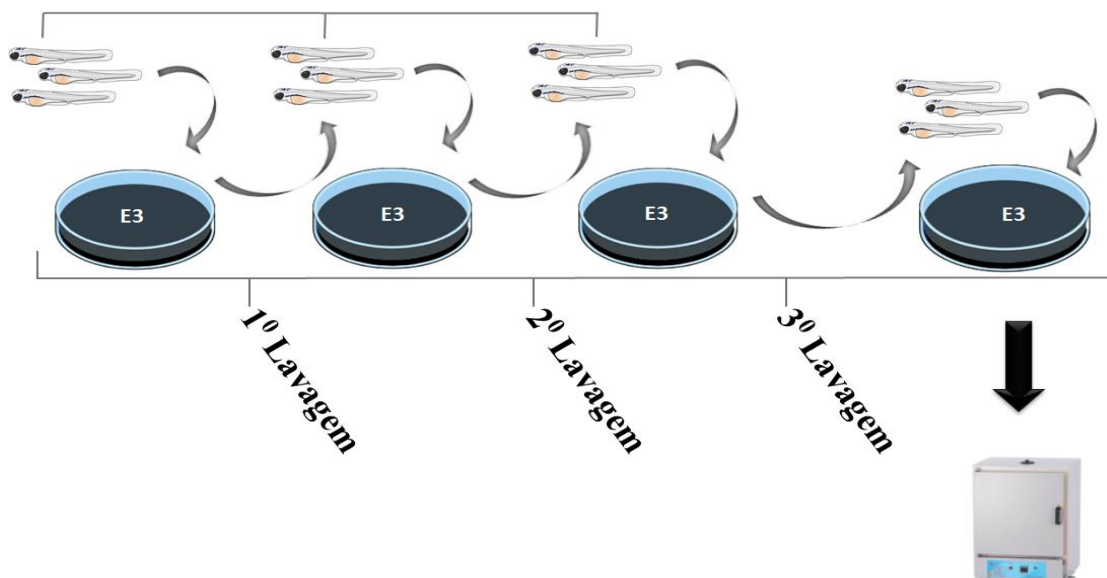
Fármacos utilizados	Código	Concentração []	Receptores	Grupos
SCH – 23390	D054	10µm	Antago subtipo D ₁	SCH
ETICLOPRIDA	E101	10µm	Antago subtipo D ₂	ETI

Tabela 2. Informações sobre fármacos, códigos, concentração das exposições e grupos.

5.1.6 Lavagem e manutenção das larvas pós tratamento

Ao final do tratamento crônico de 2 dias, as larvas foram retiradas da estufa e submetidas a lavagem em E3, Ph e temperatura ideal. As larvas foram manuseadas gentilmente com a pipeta de Pasteur, e recolocadas nas placas de petri, uma a uma, sempre em uma nova placa contendo um novo E3 por um período de 3x. Em seguida, as larvas foram recolocadas em uma quarta placa de petri contendo meio E3 e novamente acondicionadas na B.O.D a 28°C por um período de 2h para aumentar a diluição e lavagem pós exposição (Fig. 8).

Figura 8 – Lavagem das larvas pós exposição

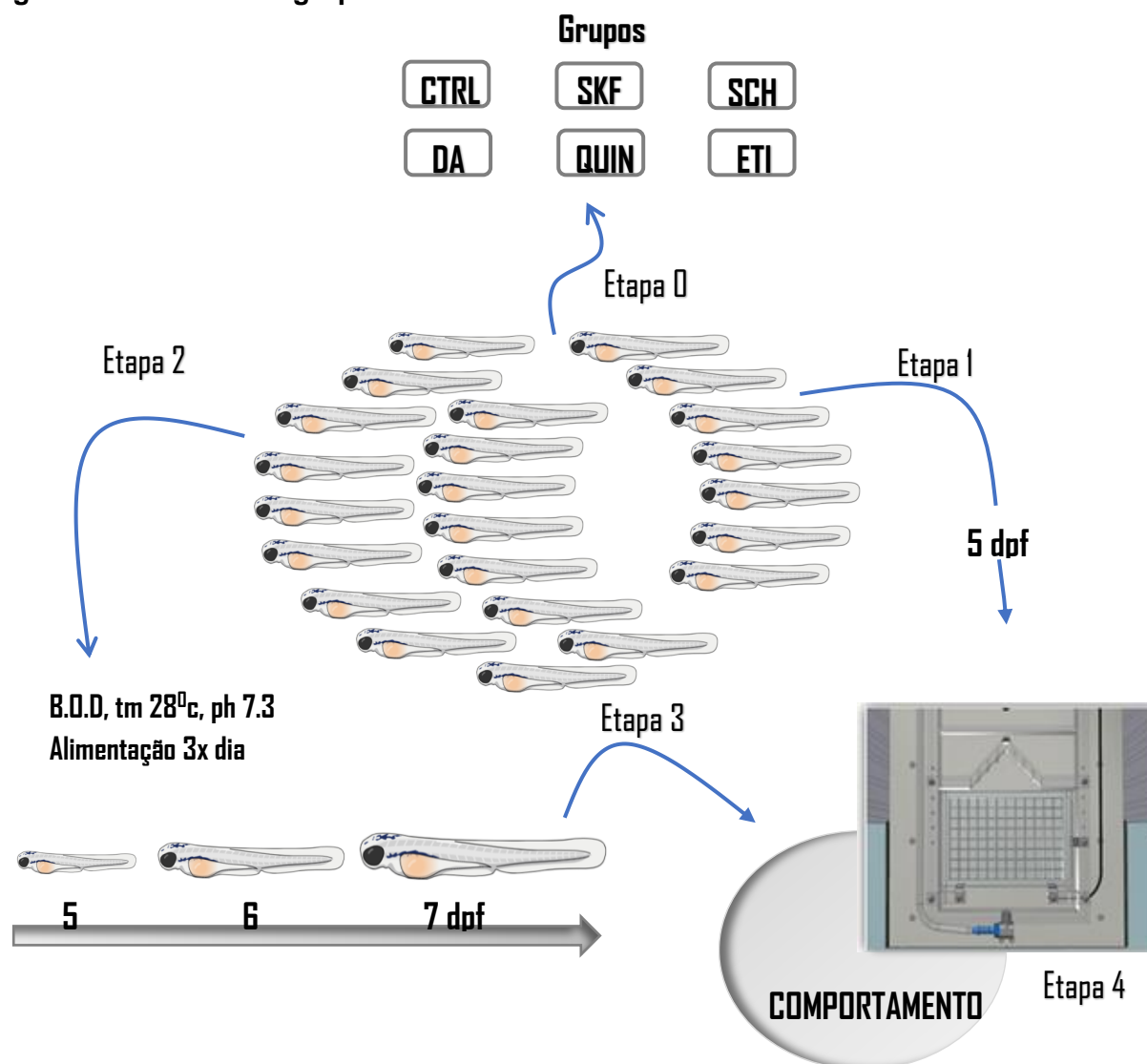


Esquema representativo da lavagem das larvas pós tratamento.

5.1.7 Divisão dos grupos

Após a lavagem, foi realizada a divisão dos grupos para dar início às análises comportamentais nas respectivas idades de 5 e 7 dpf. Todos os animais submetidos ao tratamento crônico sofreram as seguintes divisões; Todos os animais na idade de 5 dpf foram divididos em seus grupos tratados e controle (Fig. 9 – Etapa 0). Em seguida, parte dos animais de 5 dpf foram imediatamente submetidos às análises comportamentais (Fig. 9 - Etapa 1 e 4). Uma segunda parte dos animais com 5 dpf, foram dispostas novamente na B.O.D em placas de petri separadas por grupo, contendo 10 ml de E3, Ph e temperatura ideal e iniciada a alimentação com paramécio (*Paramecium* sp. 1 ml para 50 larvas) 3x vezes ao dia com troca do E3 até a idade de 7 dpf (Fig. 9 - Etapa 2). Finalmente, as larvas com 7 dpf foram submetidas as análises comportamentais nas mesmas condições dos animais de 5 dpf (Fig. 9 – Etapa 3 e 4). Todos os animais submetidos ao comportamento foram eutanasiadas a gelo -2 a -4°C e acondicionadas para um futuro descarte.

Figura 9 – Divisão dos grupos



Esquema representativo da divisão dos grupos após lavagem e comportamento. **Etapa 0.** Divisão dos grupos de acordo com o tratamento. **Etapa 1.** Parte das larvas na idade de 5 dpf foram submetidas às análises comportamentais imediatamente após a lavagem, nas condições de exposição a luz e escuro. **Etapa 2.** Parte das larvas com 5 dpf foram dispostas em placas de petri contendo E3 Ph e temperatura ideal e armazenadas na B.O.D a 28°C e mantidas até a idade de 7 dpf. **Etapa 3.** Larvas na idade de 7 dpf foram submetidas ao comportamento nas condições de exposição a luz e escuro. **Etapa 4.** Visão da câmara interna (DanioVision chamber) com a placa de comportamento acoplada. Todas as larvas em ambas idades foram separadas nos grupos a seguir; larvas com E3 (CTRL), larvas tratadas cronicamente com dopamina (DA), larvas tratadas cronicamente SKF-38393 (SKF), larvas tratadas cronicamente com quinpirole (QUIN), larvas tratadas cronicamente SCH – 23390 (SCH), larvas tratadas cronicamente com eticloprida (ETI).

5.1.8 Análise do comportamento motor no escuro e exposição a luz

A filmagem dos comportamentos teve início às 17 horas para ambas as idades de 5 e 7 dpf. As análises dos comportamentos motores foram; Latência para o primeiro episódio de movimento, episódio de movimento, duração cumulativa do episódio de movimento, distância total percorrida e velocidade média percorrida. As análises tiveram duração de 30 minutos e foram realizadas com o software (Noldus, EthoVision Danio Vision XT 11.5, câmara GigE, Blaser acA 1300 - 60 fps monocromática). Uma parte das larvas tratadas e controle nas respectivas idades de 5 e 7 dpf, foram colocadas gentilmente uma por well, com uma pipeta de Pasteur na placa de comportamento (square plate 96 well - DanioVision 12.4 x 8 cm, 12mm² por well) com 200 ul E3 com temperatura e ph ideal. Em seguida, a placa foi inserida na câmara de comportamento sem luz e configurado os parâmetros no software, ao passo que os animais habituavam em torno de 5 a 7 minutos. Para as análises do comportamento na condição de claro, foi utilizado uma lâmpada (LED DanioVision – lux 126). Em seguida, outra parte das larvas tratadas e controle, foram dispostas na placa de comportamento e inseridas na câmara e configurado os parâmetros no software, respeitando o mesmo período de habituação no ambiente iluminado. Ao final de cada comportamento, as larvas eram eutanasiadas e armazenadas para um futuro descarte.

5.1.9. Análise estatística

Para as análises dos dados obtidos, foi utilizado o software SigmaPlot 12.5. Para a análise de comportamento motor entre os grupos controle e os grupos tratados para ambas condições de exposição a luz e escuro, foi aplicado o Teste-t two tailed para análises paramétrica e o teste Mann-Whitney U Statistic para análises não paramétricas. Para verificar as múltiplas comparações do comportamento motor entre todos os grupos tratados e controle somente nas condições de exposição a luz e escuro, foi aplicado o teste Kruskal-Wallis One Way on Ranks com Método de Dunn's para pós teste, indicado para análises não paramétricas. Considerando a análise de diferença, para todos os testes, foi empregado a correção de normalidade (Shapiro wilk $p < 0,05$) e a diferença estatística simbolizada como ($*p < 0,05$) significância de

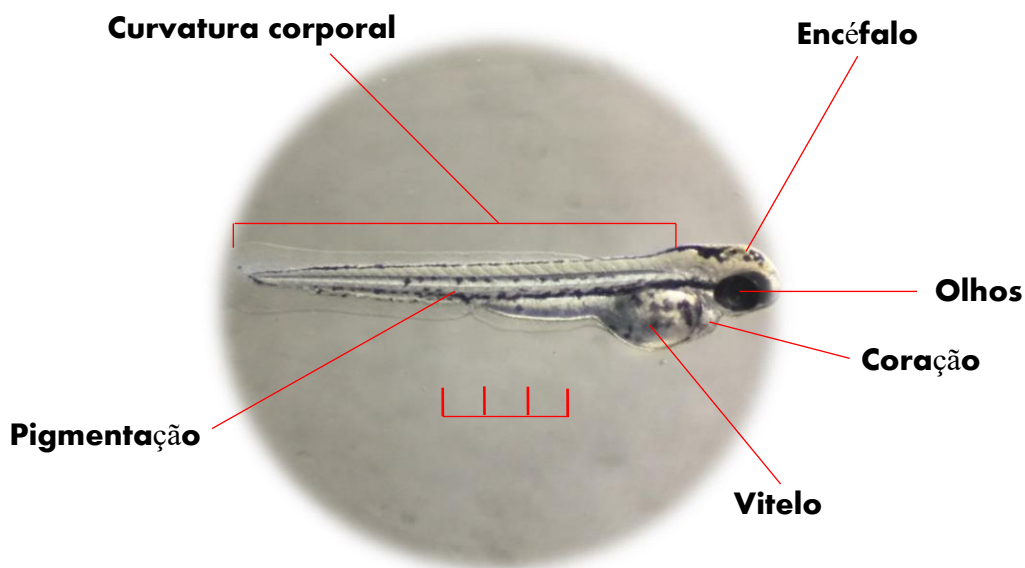
95%.

6 RESULTADOS

6.1 ANÁLISES MORFOLÓGICAS

Para compor a amostra das larvas que foram submetidas ao tratamento crônico, avaliamos as condições morfológicas apenas qualitativas apresentadas pelos animais em 3 dpf. Quanto a curvatura corporal, não observamos ocorrência de malformações e alterações de tamanho. Foi avaliado também a sincronia de nado das larvas, que exibiram movimentos espontâneos e intermitentes por curto período de tempo em ambas direções na placa de petri, por um período entre 10 e 20 minutos, o que é considerado saudável para os animais nesse período desenvolvimental. Quanto a avaliação do encéfalo, também não foram encontradas malformações. Os olhos apresentavam tamanho normal e coloração ideal. Quanto às análises cardíacas, não foram encontrados edemas pericárdicos e hemorragias. Os vitelos das larvas não exibiram edemas e se mantiveram anatomicamente saudáveis. E por fim, os somitos e melanocitos exibiram alto padrão de distribuição e se mantiveram bem delimitados (Fig 9).

Figura 10 – Análises morfológicas



Larva de zebrafish com 3 dpf e as análises morfológicas avaliadas de acordo com OECD, 2000 para composição da amostra experimental.

6.1.1 Análise do comportamento motor

Nessa abordagem, demonstramos os efeitos causados a partir da exposição crônica com os agonista (SKF-38393) e antagonista (SCH-23390) seletivos para receptores tipo-D1, e quinpirole e eticloprida como agonista e antagonista para os receptores tipo-D2 respectivamente. Avaliamos os seguintes parâmetros de comportamento motor; Distância total percorrida, velocidade média percorrida, número de episódios movimentos iniciados, latência para o primeiro episódio de movimento iniciado e duração cumulativa dos episódios de movimentos exibidos. Além disso avaliamos esses parâmetros no escuro e durante a exposição de luz e em seguida, se as alterações poderiam persistir até a idade de 7 dpf.

6.1.2 Larvas de zebrafish com 5 e 7 dpf apresentam comportamento motor diferentes em ambientes claro e escuro

6.1.1.2 Larvas de zebrafish com 5 dpf apresentam redução na latência para o primeiro episódio de movimento, no episódio de movimento e na duração cumulativa dos episódios de movimento:

Para investigar se a presença de luz alteraria o comportamento motor de larvas de zebrafish, avaliamos as respostas dos parâmetros de comportamento motor nas condições de escuro e durante a exposição a luz em larvas com 5 e 7 dpf. Sendo assim, observamos que, para a latência do primeiro episódio de movimento, existe uma redução no grupo exposto à luz (Exp. Luz) quando comparado com o escuro (Esc) ($p < 0,001$) (Fig. 11.1a).

Avaliamos o número de episódios de movimentos exibidos pelas larvas em ambas condições de escuro e exposição a luz e observamos que houve uma redução no grupo Exp. Luz quando comparado com o grupo no Esc ($p < 0,001$) (Fig. 11.1b).

Quanto a duração cumulativa dos episódios de movimento, também observamos uma redução no grupo Exp. Luz quando comparado com o grupo no Esc ($p < 0,001$) (Fig. 11.1c).

Figura - 11.1a

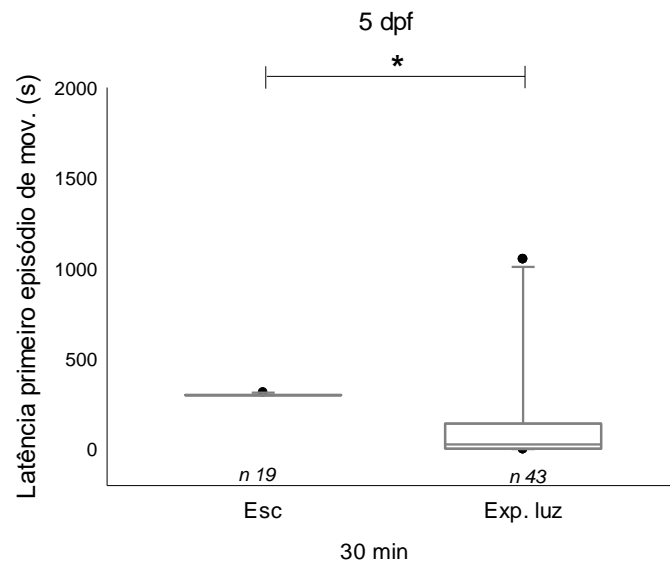


Figura 11.1b

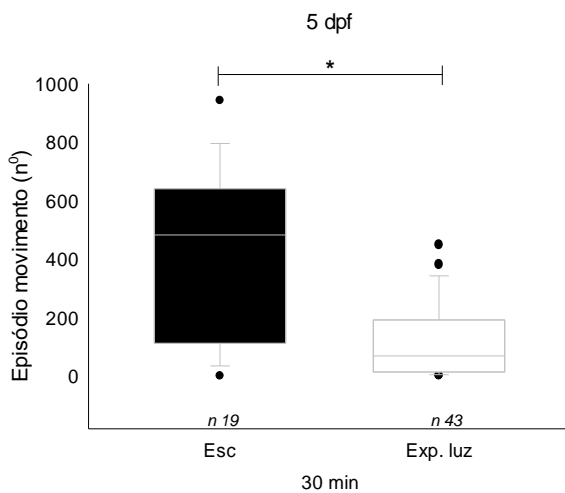


Figura 11.1c

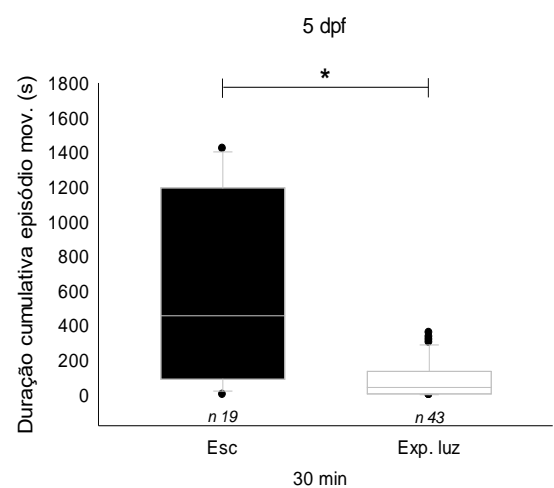


Figura 11.1a. Latência para o primeiro episódio de movimento (s) exibida durante 30 minutos nas condições de escuro e exposição a luz por larvas com 5 dpf. Figura 11.1b. Episódio de movimento (nº) exibida durante 30 minutos nas condições de escuro e exposição a luz por larvas com 5 dpf. Figura 11.1c. Duração cumulativa dos episódios de movimento (s) exibidos no escuro e durante a exposição a luz por larvas com 5 dpf. Mann-Whitney U Statistic (*p < 0,05). Escuro (Esc), Exposição a luz (Exp. Luz).

6.1.1.3 A distância total e velocidade média percorrida por larvas com 5 dpf no escuro é maior quando comparada a exposição a luz:

Observamos uma redução na distância total percorrida pelo grupo exposto à

Exp. Luz quando comparado com o grupo no Esc ($p < 0,001$) (Fig. 11.1d) e a mesma diferença foi possível observar na velocidade média ($p < 0,001$) (Fig.11.1e).

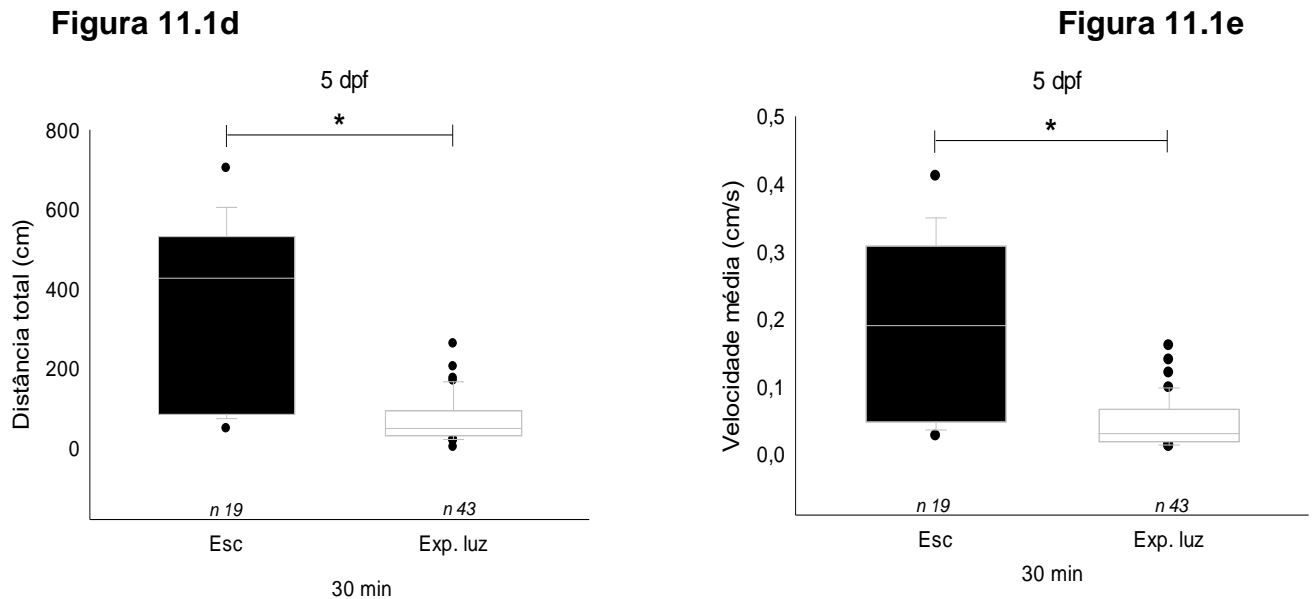


Figura 11.1d. Distância total percorrida (cm) exibida durante 30 minutos nas condições de escuro e exposição a luz por larvas com 5 dpf. Figura 11.1e. Velocidade média percorrida (cm/s) exibida durante 30 minutos nas condições de escuro e exposição a luz por larvas com 5 dpf. Mann-Whitney U Statistic (* $p < 0,05$). Escuro (Esc), Exposição a luz (Exp. Luz).

6.1.1.4 Larvas com 7 dpf apresentam aumento de latência para o primeiro episódio de movimento mas redução nos outros parâmetros do comportamento motor em ambientes claros:

Realizamos as mesmas análises à medida que os animais avançam no desenvolvimento. Por tanto, ao avaliar a latência para o primeiro episódio de movimento, ao contrário das larvas com 5 dpf, observamos um aumento na latência para o primeiro episódio de movimento em larvas com 7 dpf no claro em comparação ao escuro ($p < 0,001$) (Fig. 11.1f).

Em relação aos outros parâmetros motores, observamos similaridade ao comportamento das larvas com 5 dpf. Larvas com 7 dpf tiveram uma redução no número de episódios de movimentos em ambiente claro ($p < 0,001$) (Fig. 11.1g). O mesmo foi observado em relação à duração cumulativa dos episódios de movimento ($p < 0,001$) (Fig. 11.1h).

Figura 11.1f

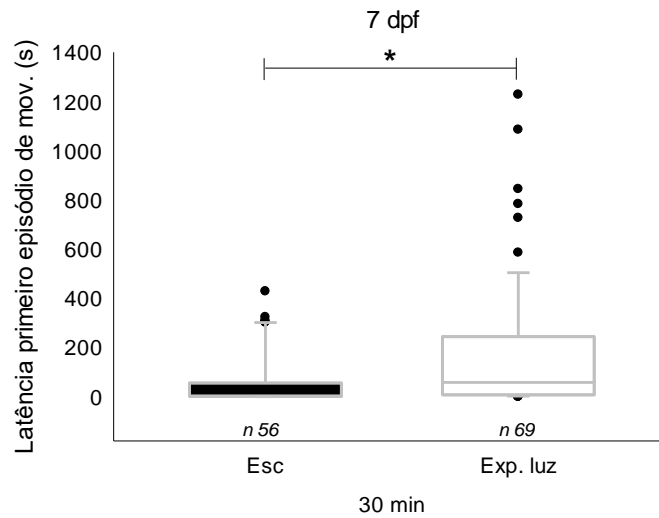


Figura 11.1g

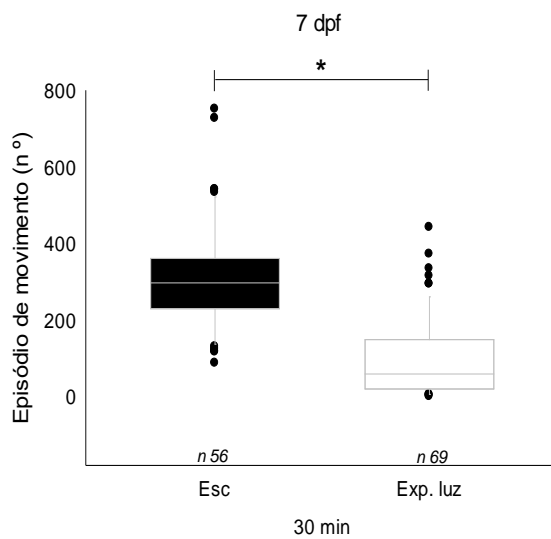


Figura 11.1h

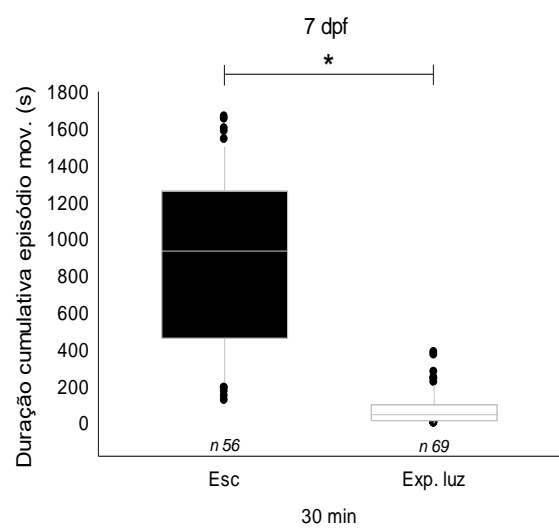


Figura 11.1f. Latência para o primeiro episódio de movimento (s) exibida durante 30 minutos nas condições de escuro e exposição a luz por larvas com 7 dpf. Figura 11.1g. Episódio de movimento (nº) exibida durante 30 minutos nas condições de escuro e exposição a luz por larvas com 7 dpf. Figura 11.1h. Duração cumulativa dos episódios de movimento no escuro e a exposição a luz por larvar com 7 dpf. Mann-Whitney U Statistic (* $p < 0,05$). Escuro (Esc), Exposição a luz (Exp. Luz).

6.1.1.5 Redução da distância total e velocidade média percorrida no claro por larvas com 7 dpf:

Ao avaliarmos a distância total percorrida, observamos uma redução em larvas com 7 dpf no claro em comparação ao escuro ($p < 0,001$) (Fig. 11.1i). E finalmente, observamos uma redução da velocidade média em larvas no claro ($p < 0,001$) (Fig.11.1j). Os resultados para ambas idades e parâmetros, estão organizados em uma tabela (tab. 3).

Figura 11.1i

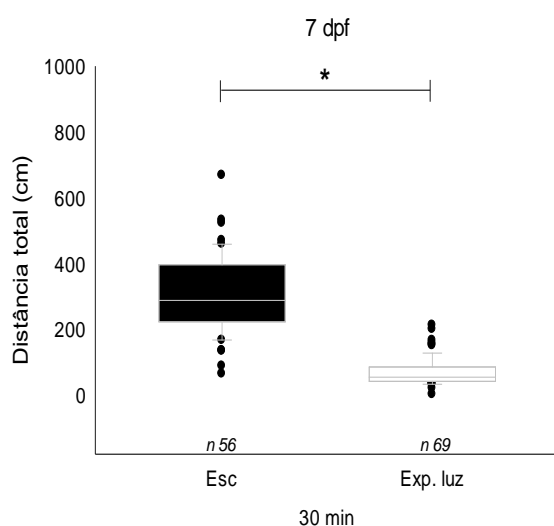


Figura 11.1j

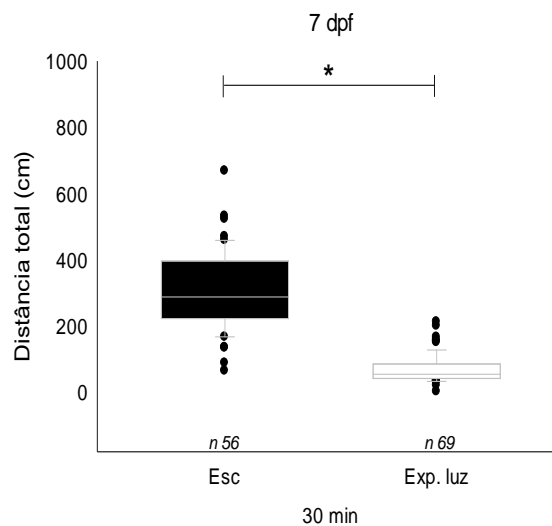


Figura 11.1i. Distância total percorrida (cm) exibida durante 30 minutos nas condições de escuro e exposição a luz por larvas com 7 dpf. Figura 11.1j. Velocidade média percorrida (cm/s) exibida durante 30 minutos nas condições de escuro e exposição a luz por larvas com 7 dpf. Mann-Whitney U Statistic (* $p < 0,05$). Escuro (Esc), Exposição a luz (Exp. luz).

6.2.1 Alteração na sinalização dopaminérgica na janela 3-5 dpf através da exposição à agonistas e antagonistas de receptores dopaminérgicos específicos altera o comportamento motor de larvas 5 dpf de formas distintas;

6.2.1.1 Antagonista de receptor D1 reduz a latência para o primeiro episódio de movimento em larvas com 5 dpf no escuro, mas não no claro:

Ao avaliarmos os parâmetros motores de larvas com 5 dpf no escuro após exposição crônica à agonistas ou antagonistas de D1 ou D2 entre 3 e 5 dpf,

observamos uma redução na latência para o primeiro episódio de movimento nas larvas expostas ao SCH-23390 comparadas com as larvas controle, expostas ao SKF-38393 e ao eticloprida ($H = 19,440$, $p < 0,002$) (Fig. 11.1k). Quando avaliamos os mesmos parâmetro durante a exposição a luz, observamos diferença entre os grupos expostos a dopamina comparado ao eticloprida ($H = 11,155$ $p < 0,048$) (Fig. 11.1L).

Em seguida, comparamos os grupos tratados para ambas condições de claro e escuro, e observamos uma redução no tempo de latência para o primeiro movimento nas larvas expostas à dopamina ($p < 0,009$) e ao SKF-38393 ($p < 0,001$) no claro comparadas ao escuro (Fig. 11.1m).

Figura 11.1k

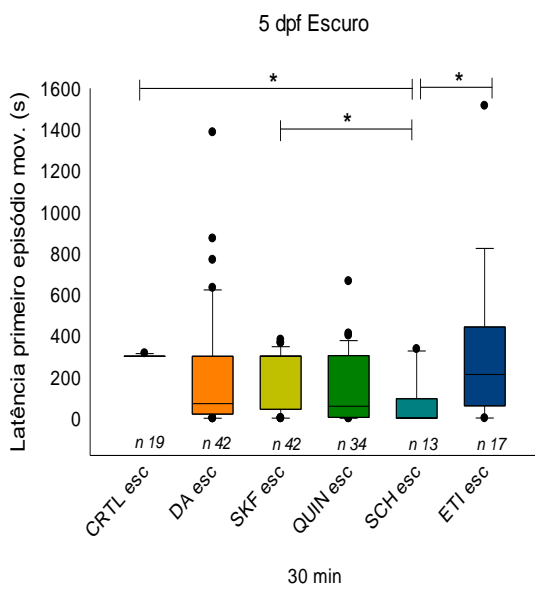


Figura 11.1L

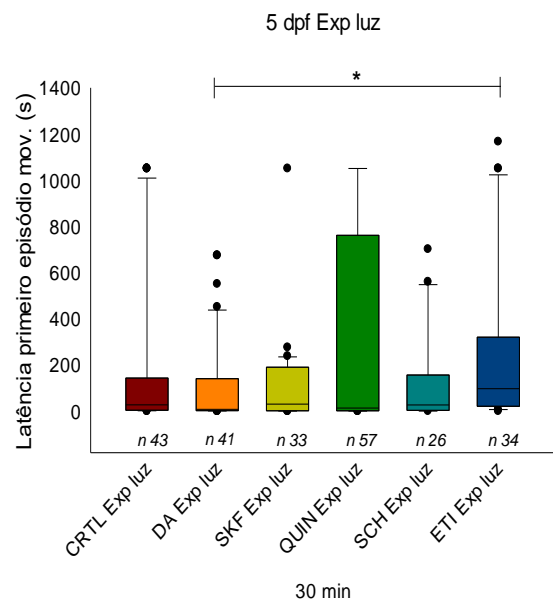


Figura 11.1m

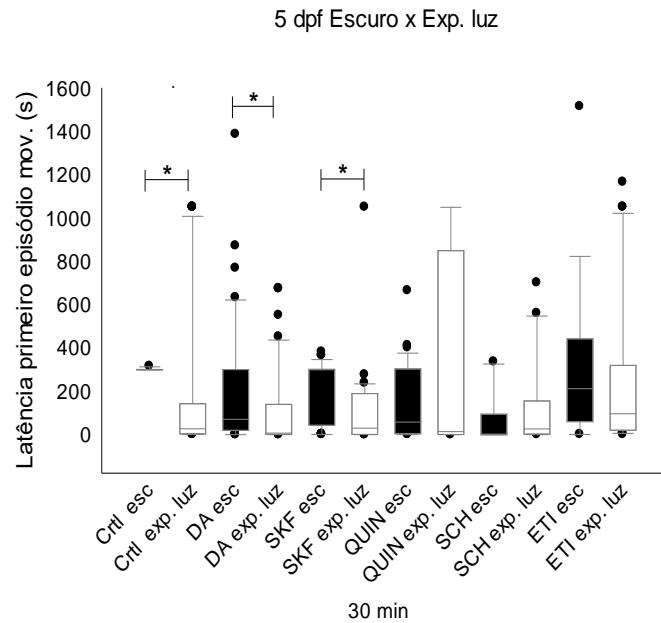


Figura 11.1k. Latência para o primeiro episódio de movimento (s) exibida durante 30 minutos no escuro por larvas com 5 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf. Figura 11.1L. Latência para o primeiro episódio de movimento (s) exibida por larvas com 5 dpf no claro tratadas entre 3 e 5 dpf, Kruskal-Wallis One Way on Ranks (* $p < 0,05$) Método Dunn's pós hoc. Figura 11.1m. Latência para o primeiro episódio de movimento (s) exibida durante 30 minutos no escuro e no claro por larvas com 5 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf, Mann-Whitney U Statistic (* $p < 0,05$). Controle escuro (CTRL. Esc), Controle exposição a luz (CTRL exp. luz), dopamina escuro (DA. esc), dopamina exposição a luz (DA exp. luz), SKF-38393 escuro (SKF. Esc), SKF-38393 exposição a luz (SKF exp. luz), quinpirole escuro (QUIN esc), quinpirole claro (QUIN exp. luz), SCH-23390 escuro (SCH esc), SCH-23390 exposição a luz (SCH exp. luz), eticloprida escuro (ETI esc), eticloprida claro (ETI exp. luz).

6.2.1.2 Exposição ao antagonista de D2 na janela desenvolvimental 3-5 dpf da larva de zebrafish diminui o número de episódios de movimento no escuro a 5 dpf:

Larvas com 5 dpf expostas ao eticloprida apresentaram redução no número de episódios de movimento exibidos por larvas com 5 dpf no escuro, comparados com controle e dopamina. Observamos também uma redução no número de episódios de movimentos no escuro das larvas expostas ao quinpirole e ao eticloprida comparadas com as larvas expostas ao SCH 23390 ($H = 33,340$ $p < 0,001$) (Fig. 11.1n). Quando avaliamos os mesmos parâmetros no claro entre os grupos expostos aos agonistas e antagonistas, não observamos nenhuma diferença estatística ($H = 8,498$ $p = 0,131$)

(Fig. 11.1o). Ao compararmos os tratamentos em ambas condições de exposição a luz e escuro, encontramos uma redução no número de episódios de movimento das larvas no escuro quando expostas ao SKF-38393 ($p < 0,001$), ao quinpirole ($p < 0,007$) e ao SCH-23390 ($p < 0,009$) (Fig. 11.1p).

Figura 11.1n

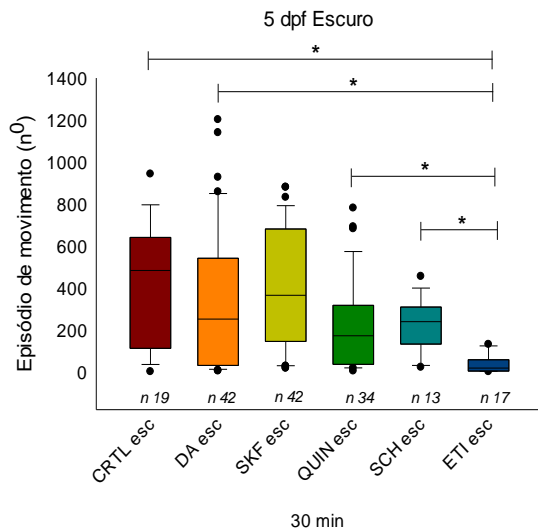


Figura 11.1o

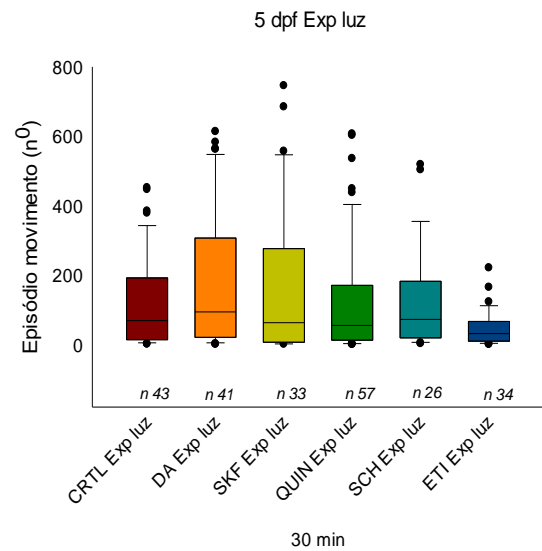


Figura 11.1p

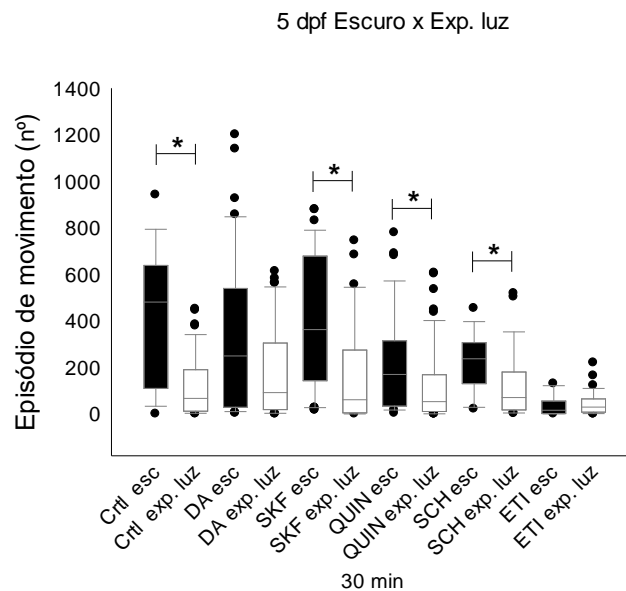


Figura 11.1n. Número de episódios de movimento (n^0) exibido durante 30 minutos no escuro por larvas com 5 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf. Figura 11.1o. Número de episódios de movimento (n^0) exibido durante 30 min por larvas com 5 dpf no claro tratadas entre 3 e 5 dpf, Kruskal-Wallis One Way on Ranks ($*p < 0,05$) Método Dunn's pós hoc. Figura 11.1p. Número de episódios de movimento (n^0) exibido durante 30 minutos no escuro e no claro por larvas com

5 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf, Mann-Whitney U Statistic (*p < 0,05). Controle escuro (CRTL. Esc), Controle exposição a luz (CRTL exp. Luz), dopamina escuro (DA. Esc), dopamina exposição a luz (DA exp. Luz), SKF-38393 escuro (SKF. Esc), SKF-38393 exposição a luz, quinpirole escuro (QUIN esc), quinpirole exposição a luz (QUIN exp. Luz), SCH-23390 escuro (SCH esc), SCH- 23390 exposição a luz (SCH exp. Luz), eticloprida escuro (ETI esc), eticloprida exposição a luz (ETI exp. Luz).

6.2.1.3 Larvas com 5dpf expostas ao agonista e ao antagonista de D2 apresentaram redução na duração cumulativa dos episódios de movimento:

Ao avaliarmos a duração cumulativa dos episódios de movimento no escuro, observamos um redução nas lavas expostas ao eticloprida comparadas ao grupo controle, dopamina, quinpirole e SCH-23390 (H = 42,430 p < 0,001) (Fig. 11.1q). Por outro lado, somente as larvas expostas ao eticloprida tiveram alteração na duração cumulativa dos episódios de movimento avaliados no claro, com redução quando comparadas às larvas expostas à dopamina (H = 11,710 p < 0,039) (Fig. 11.1r).

Ao comparar os grupos no claro e no escuro, observamos uma redução na duração cumulativa dos episódios de movimento nas larvas avaliadas no claro dos grupos SKF-38393 (p < 0,001), quinpirole (p < 0,013) e SCH-23390 (p < 0,001) (Fig.11.1s).

Figura 11.1q

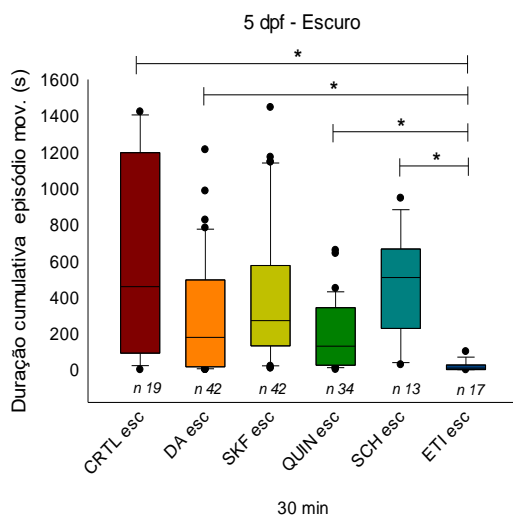


Figura 11.1r

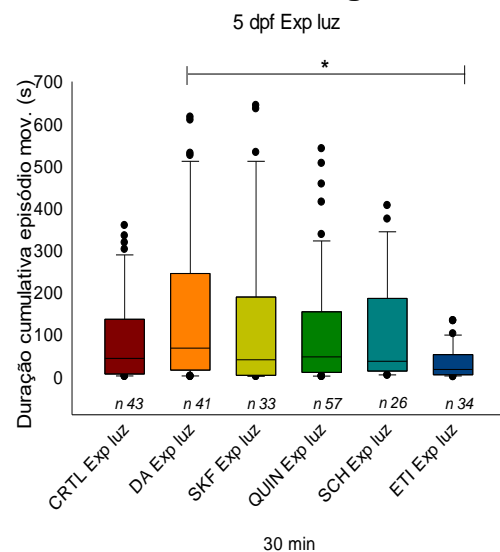


Figura 11.1s

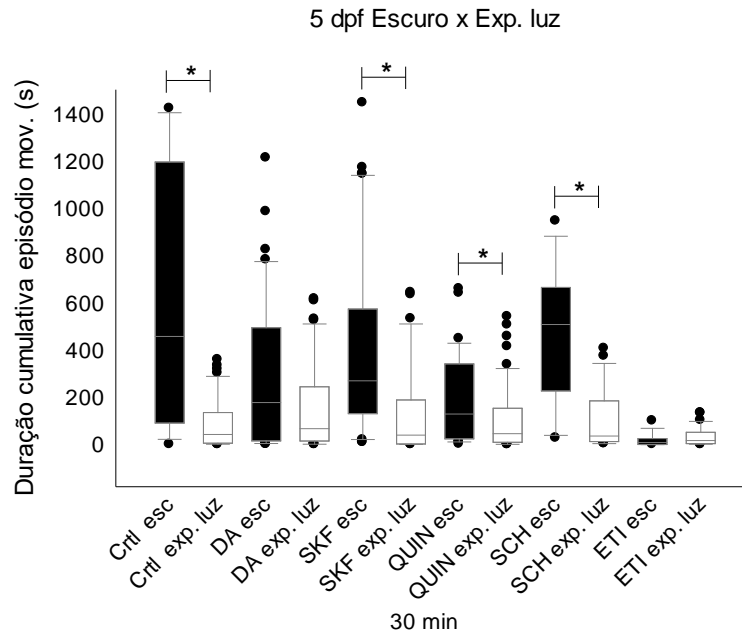


Figura 10.1q. Duração cumulativa dos episódios de movimento (s) exibido durante 30 minutos no escuro por larvas com 5 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf. Figura 10.1r. Duração cumulativa dos episódios de movimento (s) exibido durante 30 minutos por larvas com 5 dpf no claro tratadas entre 3 e 5 dpf, Kruskal-Wallis One Way on Ranks (* $p < 0,05$) Método Dunn's pós hoc. Figura 10.1s. Duração cumulativa dos episódios de movimento (s) exibido durante 30 minutos no escuro e no claro por larvas com 5 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf, Mann-Whitney U Statistic (* $p < 0,05$). Controle escuro (CRTL. Esc), Controle exposição a luz (CRTL exp. Luz), dopamina escuro (DA. Esc), dopamina exposição a luz (DA exp. Luz), SKF-38393 escuro (SKF. Esc), SKF-38393 exposição a luz, quinpirole escuro (QUIN esc), quinpirole exposição a luz (QUIN exp. Luz), SCH-23390 escuro (SCH esc), SCH- 23390 exposição a luz (SCH exp. Luz), eticloprida escuro (ETI esc), eticloprida exposição a luz (ETI exp. Luz).

6.2.1.4 Larvas com 5 dpf expostas à dopamina e aos agonistas e antagonistas de D2 do 3 ao 5 dpf apresentam redução da distância total percorrida no escuro:

Avaliamos a distância total percorrida no escuro e observamos uma redução nas larvas com 5 dpf expostas à ao eticloprida comparado a dopamina, SCH 23390 e ao controle. As larvas expostas ao quinpirole apresentou uma redução quando comparada ao controle ($H = 32,532$ $p < 0,001$) (Fig. 11.1t).

Ao avaliarmos a distância total percorrida no claro, não observamos nenhuma diferença estatística entre os grupos ($H = 7,143$, $p = 0,210$) (Fig. 11.1u). Ao

compararmos os grupos claro e escuro, encontramos uma redução na distância total percorrida no escuro SKF-38393 ($p < 0,001$), quinpirole ($p < 0,001$), SCH-23390 ($p < 0,00000303$), eticloprida ($p < 0,011$) e na distância total percorrida expostas à dopamina ($p < 0,001$) (Fig. 11.1v).

Figura 11.1t

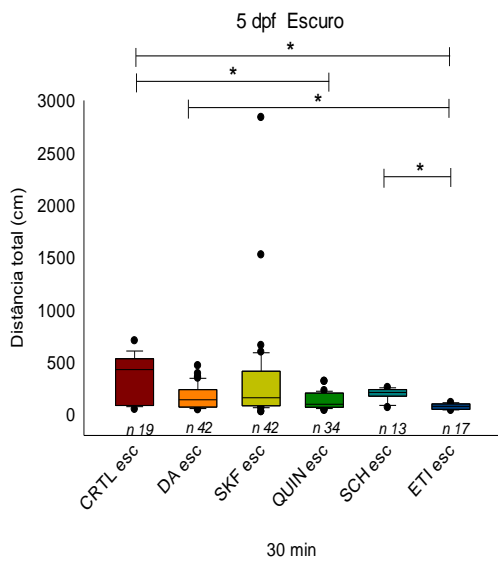


Figura 11.1u

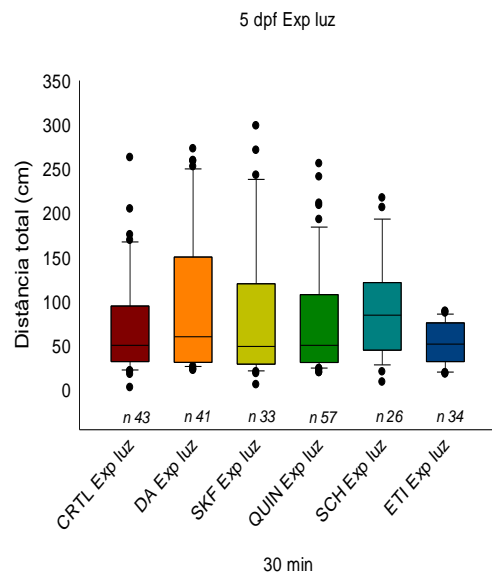


Figura 11.1v

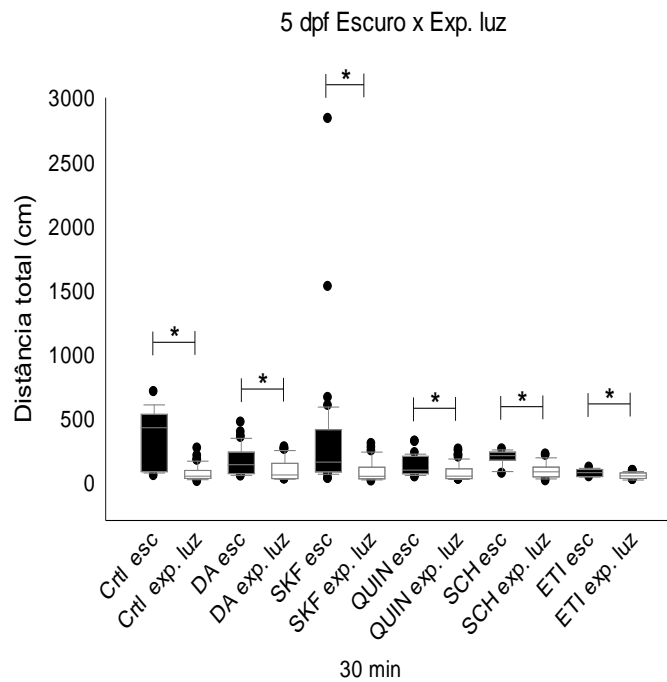


Figura 11.1t. Distância total percorrida (cm) durante 30 minutos no escuro por larvas com 5 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf. Figura 11.1u. Distância total percorrida (cm) durante 30 min por larvas com 5 dpf no claro tratadas entre 3 e 5 dpf, Kruskal-Wallis One Way on Ranks (*p < 0,05) Método Dunn's pós hoc. Figura 11.1v. Distância total percorrida durante 30 minutos no escuro e durante a exposição a luz por larvas com 5 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf. Mann-Whitney U Statistic (*p < 0,05) e Test t two tailed (*p = < 0,05). Controle escuro (CTRL. Esc), Controle exposição a luz (CTRL exp. Luz), dopamina escuro (DA. Esc), dopamina exposição a luz (DA exp. Luz), SKF-38393 escuro (SKF. Esc), SKF-38393 exposição a luz, quinpirole escuro (QUIN esc), quinpirole exposição a luz (QUIN exp. Luz), SCH-23390 escuro (SCH esc), SCH- 23390 exposição a luz (SCH exp. Luz), eticloprida escuro (ETI esc), eticloprida exposição a luz (ETI exp. Luz).

6.2.1.5 Larvas com 5 dpf expostas ao agonista ou ao antagonista do D2 entre 3-5 dpf apresentam redução da velocidade média no escuro:

Identificamos uma redução da velocidade média no escuro das larvas com 5 dpf dos grupos quinpirole e eticloprida quando comparadas ao controle. Observamos também uma redução na velocidade média das larvas do grupo eticloprida comparada com o grupo SCH-23390 ($H = 27,863$, $p < 0,001$) (Fig. 11.1w). Não observamos nenhuma diferença estatística entre os grupos na condição de claro ($H = 4,742$, $p = 0,448$) (Fig. 11.1x).

Quando comparamos a velocidade média dos grupos no claro e no escuro observamos uma redução no comportamento no claro das larvas dos grupos expostos à dopamina ($p < 0,001$), ao SKF-38393 ($p < 0,001$), quinpirole ($p < 0,001$), SCH-23390 ($p < 0,00000657$) (Fig. 11.1y).

Figura 11.1w

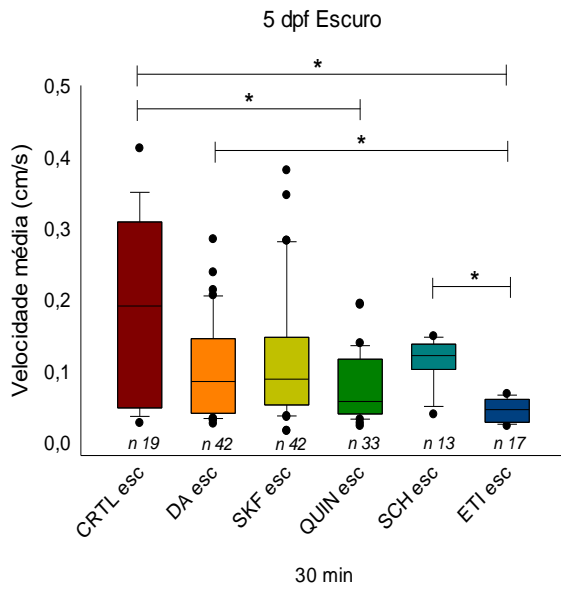


Figura 11.1x

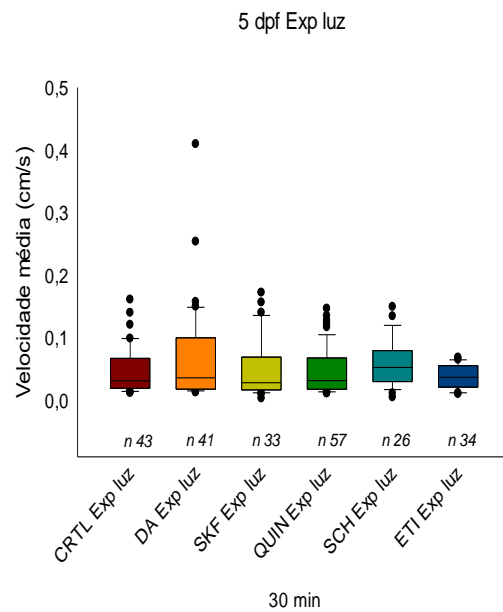


Figura 11.1y

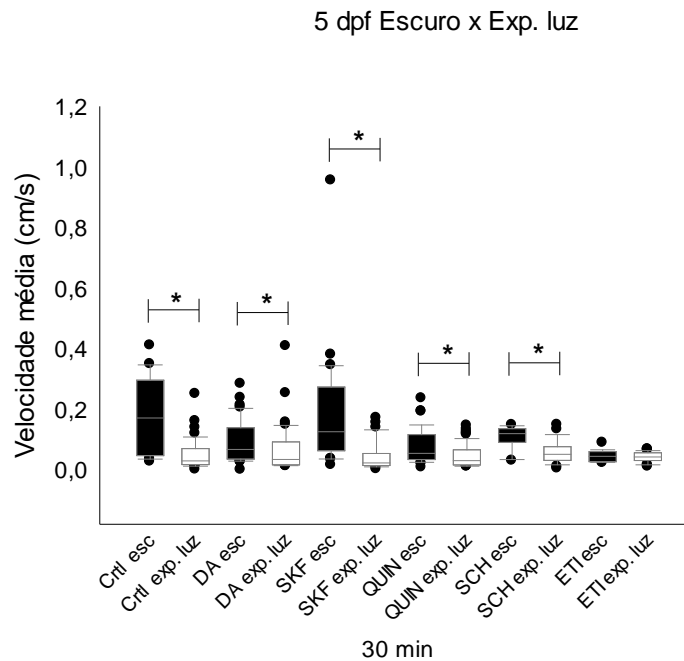


Figura 11.1w. Velocidade média percorrida (cm/s) durante 30 minutos no escuro por larvas com 5 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf. Figura 11.1x. Velocidade média percorrida (cm/s) durante 30 min por larvas com 5 dpf no claro tratadas entre 3 e 5 dpf, Kruskal-Wallis One Way on Ranks (*p < 0,05) Método Dunn's pós hoc. Figura 11.1y. Velocidade média percorrida durante 30 minutos no escuro e no claro por larvas com 5 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf, Mann-Whitney U Statistic (*p < 0,05) e Test t two tailed (*p = < 0,05). Controle no escuro (CTRL. Esc), Controle exposição a luz (CTRL exp. luz), dopamina escuro (DA. esc), dopamina exposição a luz (DA

exp. luz), SKF-38393 escuro (SKF. Esc), SKF-38393 exposição a luz, quinpirole escuro (QUIN esc), quinpirole exposição a luz (QUIN exp. luz), SCH-23390 escuro (SCH esc), SCH- 23390 exposição a luz (SCH exp. luz), eticloprida escuro (ETI esc), eticloprida exposição a luz (ETI exp. luz).

6.3.1 Exposição de larvas de zebrafish a agonistas e antagonistas de receptores dopaminérgicos D1 ou D2, entre 3 e 5 dpf, altera parâmetros do comportamento motor aos 7 dpf de formas distintas no claro e no escuro

6.3.1.1 A exposição a agonista de D1 ou de D2 entre 3 e 5 dpf aumenta a latência para o primeiro episódio de movimento em larvas com 7 dpf no escuro:

Comparadas ao grupo controle, observamos aumento na latência para o primeiro episódio de movimento no escuro em larvas com 7 dpf, previamente expostas com SKF-38393 e quinpirole entre 3 e 5 dpf. Os mesmos grupos apresentaram aumento na latência para o primeiro episódio de movimento quando comparados ao grupo exposto à dopamina. Finalmente, observamos um aumento na latência nas lavas expostas ao SKF-38393 comparadas ao grupo SCH-23390, e das larvas expostas ao quinpirole comparadas ao grupo eticloprida ($H = 44,734$, $p < 0,001$) (Fig. 11.2a).

Não observamos diferenças entre os grupos quando a análise da latência para o primeiro episódio de movimento é realizada no claro ($H = 4,652$, $p < 0,460$) (Fig. 11.2b). Ao compararmos os grupos analisados no claro e no escuro, observamos que as larvas expostas à dopamina ($p < 0,009$), SCH-23390 ($p < 0,001$) ou eticloprida ($p < 0,003$) apresentaram aumento na latência. De outra forma, somente as larvas expostas ao SKF-38393 ($p < 0,001$) apresentaram redução na latência para o primeiro episódio de movimento no claro (Fig. 11.2c).

Figura 11.2a

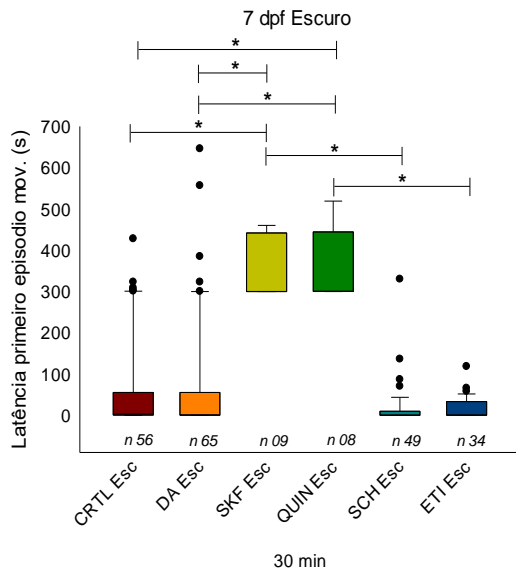


Figura 11.2b

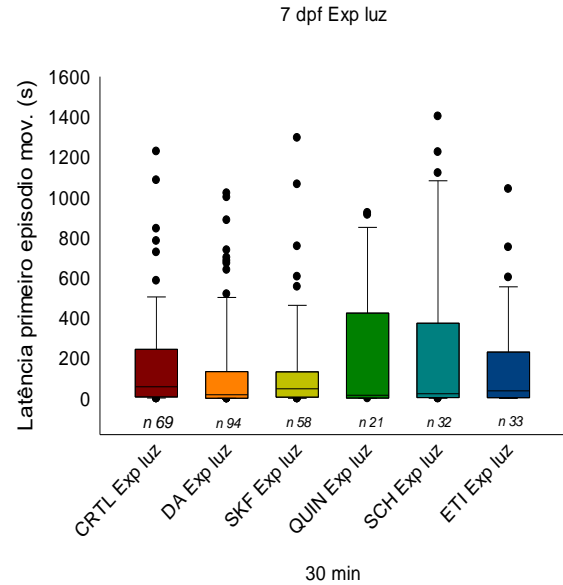


Figura 11.2c

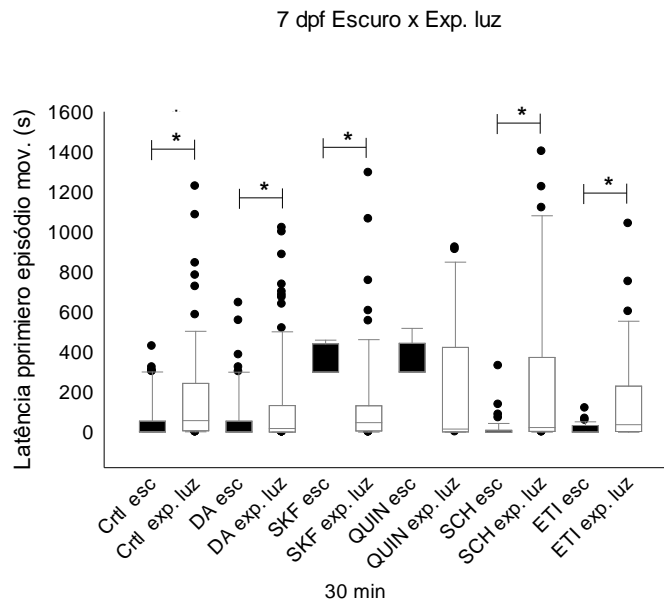


Figura 11.2a. Latência para o primeiro episódio de movimento (s) exibida durante 30 minutos no escuro por larvas com 7 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf. Figura 11.2b. Latência para o primeiro episódio de movimento (s) exibida por larvas com 7 dpf no claro tratadas entre 3 e 5 dpf, Kruskal-Wallis One Way on Ranks (* $p < 0,05$) Método Dunn's pós hoc. Figura 11.2c. Latência para o primeiro episódio de movimento (s) exibida durante 30 minutos no escuro e no claro por larvas com 7 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf. Mann-Whitney U Statistic (* $p < 0,05$). Controle escuro (CRTL. Esc), Controle exposição a luz (CRTL exp. luz), dopamina escuro (DA. esc),

dopamina exposição a luz (DA exp. luz), SKF-38393 escuro (SKF. Esc), SKF-38393 exposição a luz (SKF exp. luz), quinpirole escuro (QUIN esc), quinpirole exposição a luz (QUIN exp. luz), SCH-23390 escuro (SCH esc), SCH- 23390 exposição a luz (SCH exp. luz), eticloprida escuro (ETI esc), eticloprida exposição a luz (ETI exp. luz).

6.3.1.2 Larvas com 7 dpf expostas ao agonista de D1 entre 3 e 5 dpf, apresentam redução no número de episódios de movimento:

Não observamos alterações no número de episódios de movimento entre os grupos quando analisados no claro (H = 10,656, p = 0,059) (Fig. 11.2d). De outra forma, encontramos uma redução no número de episódios de movimento em lavas expostas ao SKF 38393 comparada ao SCH 23390 na condição de escuro (H = 19,107, p < 0,002) (Fig. 11.2e). No entanto, ao comparar as análises comportamentais no claro e no escuro dos grupos, encontramos uma redução no número de episódios de movimento no claro nas larvas expostas à dopamina (p < 0,001), ao quinpirole (p < 0,023) ao SCH-23390 (p < 1,486E-017) e ao eticloprida (p < 0,001) (Fig. 11.2f).

Figura 11.2d

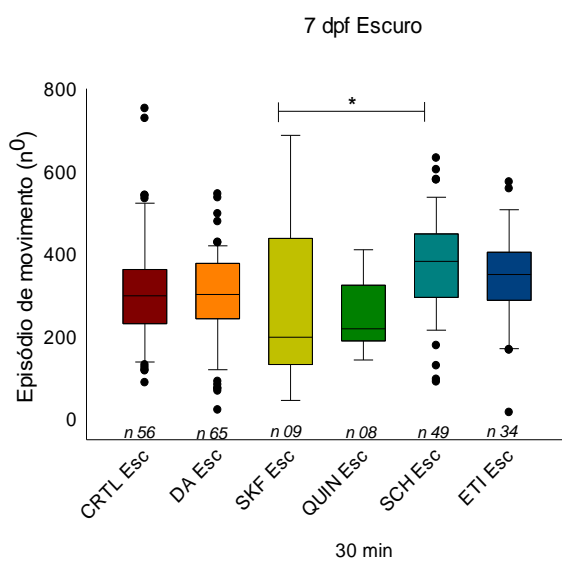


Figura 11.2e

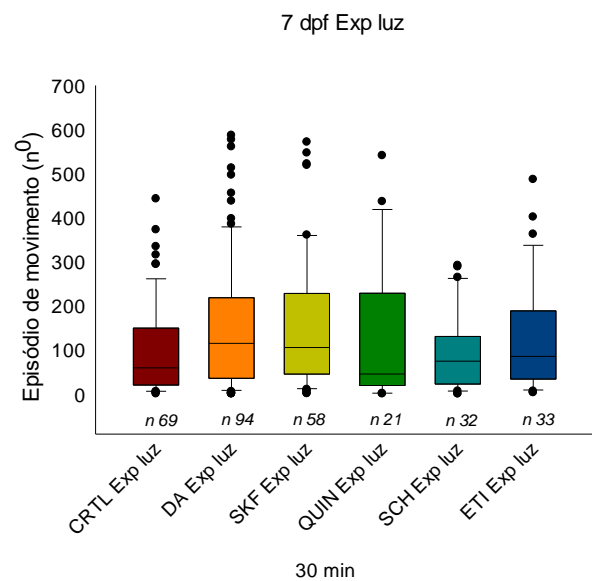


Figura 11.2f

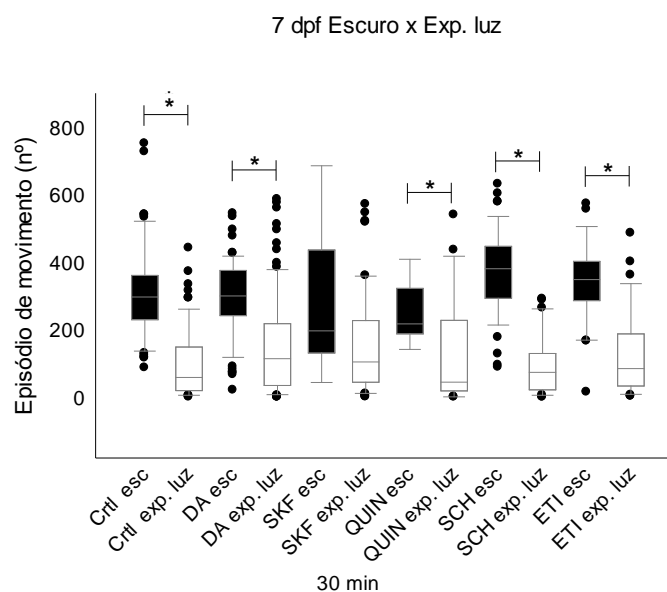


Figura 11.2d. Episódio de movimento (no) exibida durante 30 minutos no escuro por larvas com 7 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf. Figura 11.2e. Episódio de movimento (no) exibida durante 30 minutos por larvas com 7 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf no claro, Kruskal-Wallis One Way on Ranks (* $p < 0,05$) Método Dunn's pós hoc. Figura 11.2f. Episódio de movimento (no) exibida 30 minutos no escuro e no claro por larvas com 7 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf, Mann-Whitney U Statistic (* $p < 0,05$) e Test t two tailed (* $p = < 0,05$). Controle escuro (CTRL. Esc), Controle exposição a luz (CTRL exp. luz), dopamina escuro (DA. esc), dopamina exposição a luz (DA exp. luz), SKF-38393 escuro (SKF. Esc), SKF-38393 exposição a luz, quinpirole escuro (QUIN esc), quinpirole exposição a luz (QUIN exp. luz), SCH-23390 escuro (SCH esc), SCH- 23390 exposição a luz (SCH exp. luz), eticloprida escuro (ETI esc), eticloprida exposição a luz (ETI exp. luz).

6.3.1.3 Larvas expostas aos agonistas de D1 e D2 entre 3 e 5 dpf apresentam redução na duração cumulativa dos episódios de movimento com 7 dpf no escuro:

As larvas expostas ao quinpirole entre 3 e 5 dpf apresentaram diminuição na duração cumulativa dos episódios de movimentos ao 7dpf no escuro, quando comparadas aos grupos controle, dopamina e eticloprida. Observamos também uma redução na duração cumulativa dos episódios de movimentos no escuro nas larvas expostas ao SKF-38393 quando comparadas aos grupos dopamina e SCH-23390 (H

= 55,531, $p < 0,001$) (Fig. 11.2g). Ao avaliarmos a duração cumulativa dos episódios de movimento no claro, não encontramos nenhuma diferença entre os grupos ($H = 10,721$, $p < 0,057$) (Fig. 11.2h).

Entretanto ao compararmos a duração cumulativa no claro e no escuro, observamos uma redução no claro das larvas expostas à dopamina ($p < 0,001$), ao SCH-23390 ($p < 0,001$) ou ao eticloprida ($p < 0,001$). As larvas expostas ao SKF-38393 ($p < 0,002$) e ao quinpirole ($p < 0,004$) apresentaram redução da duração cumulativa quando avaliadas no claro (Fig. 11.2i).

Figura 11.2g

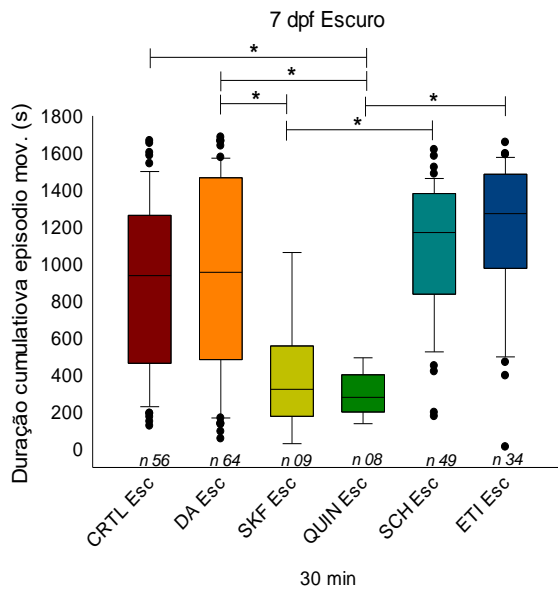


Figura 11.2h

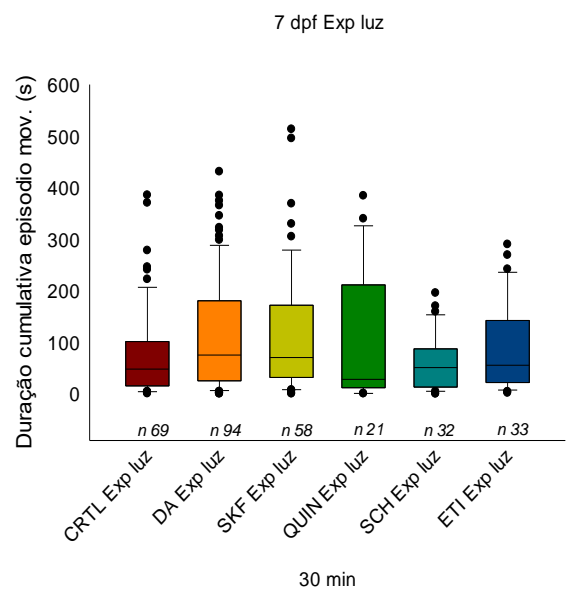


Figura 11.2i

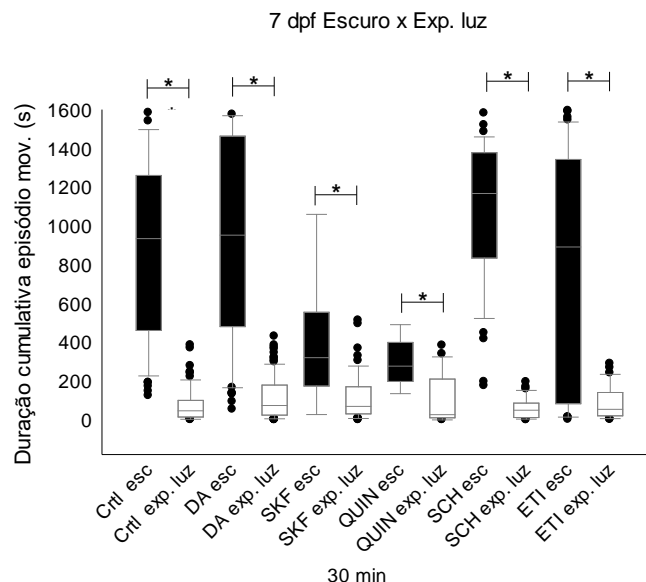


Figura 11.2g. Duração cumulativa dos episódios de movimento (s) exibida durante 30 minutos no escuro por larvas com 7 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf. Figura 11.2h. Duração cumulativa dos episódios de movimento (s) exibida durante 30 min por larvas com 7 dpf no claro tratadas entre 3 e 5 dpf, Kruskal-Wallis One Way on Ranks (* $p < 0,05$) Método Dunn's pós hoc. Figura 11.2i. Duração cumulativa dos episódios de movimento (s) exibida 30 minutos no escuro e no claro por larvas com 7 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf, Mann-Whitney U Statistic (* $p < 0,05$). Controle escuro (CTRL. Esc), Controle exposição a luz (CTRL exp. luz), dopamina escuro (DA. esc), dopamina exposição a luz (DA exp. luz), SKF-38393 escuro (SKF. Esc), SKF-38393 exposição a luz, quinpirole escuro (QUIN esc), quinpirole exposição a luz (QUIN exp. luz), SCH-23390 escuro (SCH esc), SCH- 23390 exposição a luz (SCH exp. luz), eticloprida escuro (ETI esc), eticloprida exposição a luz (ETI exp. luz).

6.3.1.4 Larvas expostas ao agonista de receptores D1 ou D2 entre 3 e 5 dpf apresentaram diminuição na distância total percorrida no escuro aos 7 dpf:

Ao avaliarmos a distância total percorrida no escuro em larvas com 7 dpf, observamos uma redução nas larvas expostas ao quinpirole comparadas com os grupos controle, dopamina e eticloprida. Também observamos uma redução nas larvas expostas ao SKF-38393 quando comparadas com o grupo SCH-23390 ($H = 34,662$ $p < 0,001$) (Fig. 11.2j). Quanto a distância total percorrida por larvas com 7 dpf no claro, não observamos redução nas larvas ($H = 10,783$, $p = 0,054$) (Fig. 11.2k).

Adicionalmente, quando comparamos os tratamentos nas condições claro e

escuro, observamos uma redução na distância total percorrida no claro nos grupos dopamina ($p < 0,001$), SKF-38393 ($p < 0,002$), quinpirole ($p < 0,002$), SCH-23390 ($p < 0,001$) e eticloprida ($p < 0,001$) (Fig. 11.2L).

Figura 11.2j

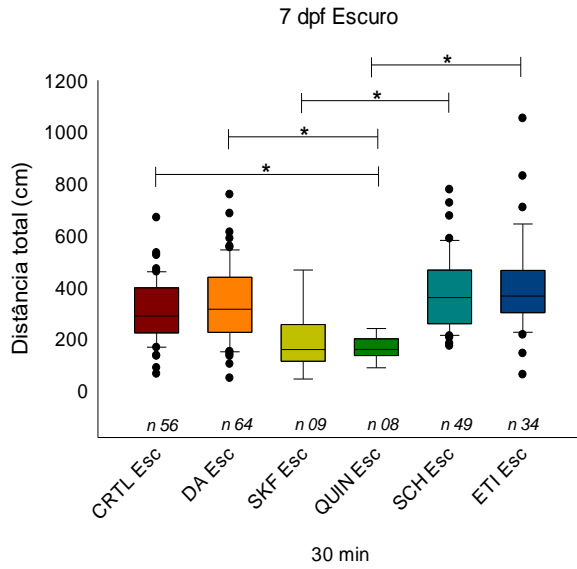


Figura 11.2k

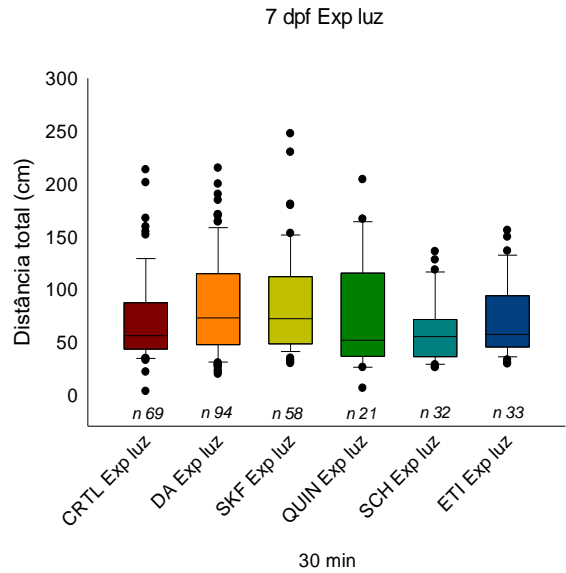


Figura 11.2L

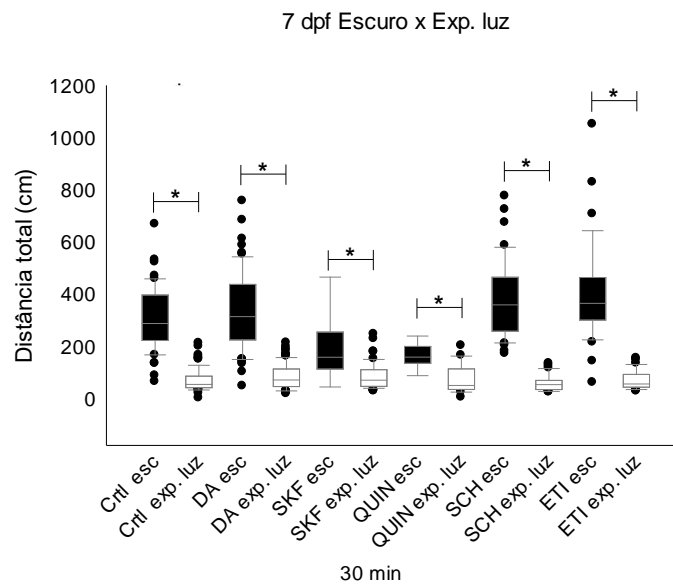


Figura 11.2j. Distância total percorrida (cm) durante 30 minutos no escuro por larvas com 7 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf. Figura 11.2k. Distância total percorrida (cm) durante 30 min por larvas com 7 dpf no claro tratadas entre 3 e 5 dpf, Kruskal-Wallis One Way on Ranks ($*p < 0,05$) Método Dunn's pós hoc. Figura 11.2L. Distância total percorrida durante 30 minutos no escuro e no claro por larvas com 7 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf, Mann-Whitney U Statistic ($*p$

< 0,05) e Test t two tailed (*p = < 0,05). Controle escuro (CTRL. Esc), Controle exposição a luz (CTRL exp. luz), dopamina escuro (DA. esc), dopamina exposição a luz (DA exp. luz), SKF-38393 escuro (SKF. Esc), SKF-38393 exposição a luz, quinpirole escuro (QUIN esc), quinpirole exposição a luz (QUIN exp. luz), SCH-23390 escuro (SCH esc), SCH- 23390 exposição a luz (SCH exp. luz), eticloprida escuro (ETI esc), eticloprida exposição a luz (ETI exp. luz).

6.1.3.5 A velocidade média de larvas com 7 dpf no escuro é menor nas larvas expostas aos agonistas de D1 ou de D2 entre 3 e 5 dpf:

No parâmetro de velocidade média no escuro, observamos uma redução nas larvas expostas ao quinpirole comparadas aos grupos controle, dopamina e eticloprida. Também observamos redução da velocidade média nas larvas com 7 dpf expostas ao SKF-38393 quando comparadas com os grupos dopamina e SCH-23390 ($H = 38,629$ $p < 0,001$) (Fig. 11.2m). No claro, não observamos nenhuma diferença estatística entre os grupos ($H = 12,144$, $p < 0,033$) (Fig. 11.2n).

Quando comparamos os grupos em ambas condições de claro e escuro, encontramos redução de velocidade média analisada no claro dos grupos dopamina ($p < 0,001$), SKF-38393 ($p < 0,002$), quinpirole ($p < 0,003$), SCH-23390 ($p < 0,001$) ou eticloprida ($p < 0,001$) (Fig. 11.2o). O resumo dos reestudados e a alterações comportamentais para ambas idades na condição do ambiente iluminado e escuro, estão disponíveis na tabela 4.

Figura 11.2m

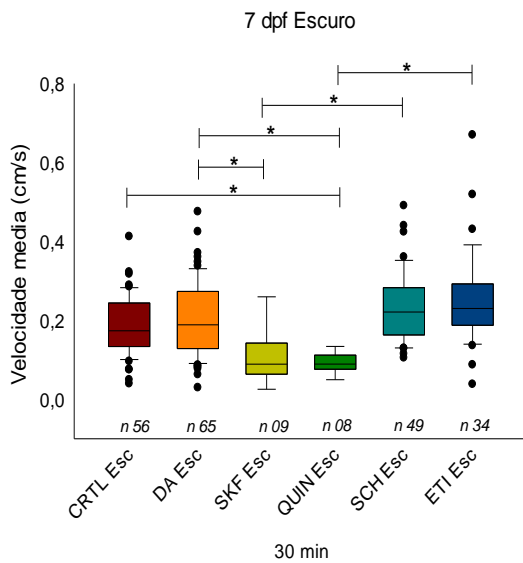


Figura 11.2n

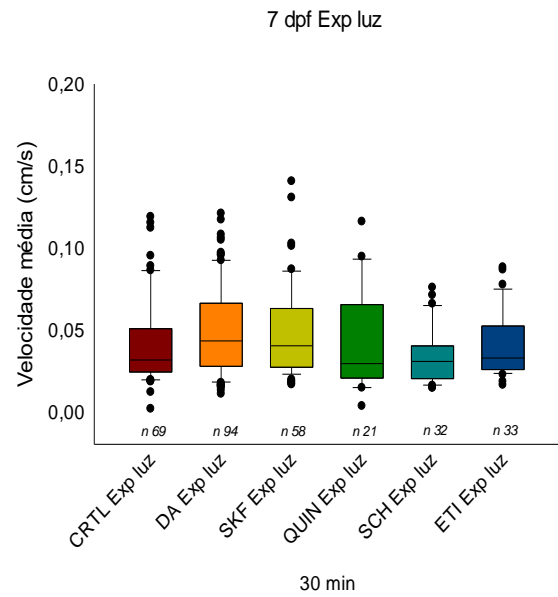


Figura 11.2o

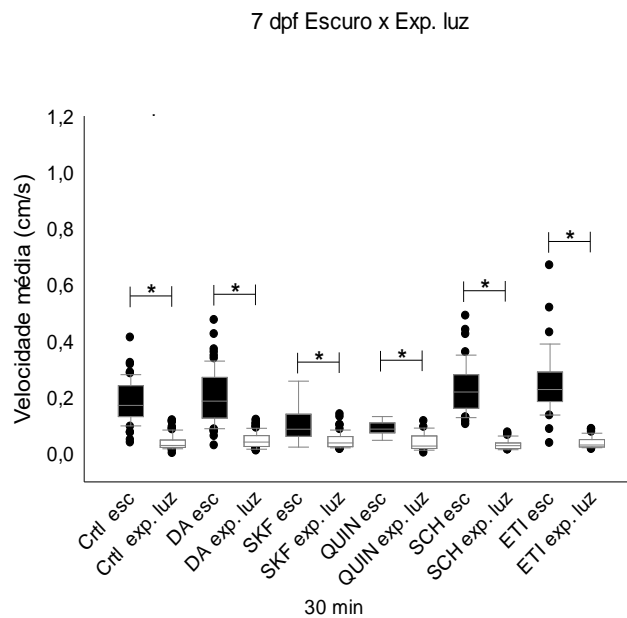


Figura 10.2m. Velocidade média percorrida (cm/s) durante 30 minutos no escuro por larvas com 7 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf. Figura 10.2n. Velocidade média percorrida (cm/s) durante 30 min por larvas com 7 dpf no claro tratadas entre 3 e 5 dpf, Kruskal-Wallis One Way on Ranks (* $p < 0,05$) Método Dunn's pós hoc. Figura 10.2o. Velocidade média (cm/s) percorrida durante 30 minutos no escuro e no claro por larvas com 7 dpf tratadas entre 3 e 5 dpf, Mann-Whitney U Statistic (* $p < 0,05$) e Test t two tailed (* $p = < 0,05$). Controle escuro (CRTL. Esc), Controle exposição a luz (CRTL exp. luz), dopamina escuro (DA. esc), dopamina exposição a

luz (DA exp. luz), SKF-38393 escuro (SKF. Esc), SKF-38393 exposição a luz, quinpirole escuro (QUIN esc), quinpirole exposição a luz (QUIN exp. luz), SCH-23390 escuro (SCH esc), SCH- 23390 exposição a luz (SCH exp. luz), eticloprida escuro (ETI esc), eticloprida exposição a luz (ETI exp. luz).

Tabela 3 – Resultados entre os grupos para a condição de exposição a luz e escuro

Grupos controle	Latência primeiro episódio mov. (s)	Episódio movimento (s)	Duração cumulativa episódio mov. (s)	Distância total (cm)	Velocidade média (cm/s)
Exp. luz 5 dpf	p < 0,001 ↓	p < 0,001 ↓	p < 0,001 ↓	p < 0,001 ↓	p < 0,001 ↓
Exp. luz 7 dpf	p < 0,001 ↑	p < 0,001 ↓	p < 0,001 ↓	p < 0,001 ↓	p < 0,001 ↓

Tabela. Resultados dos grupos controles e os parâmetros de locomoção no escuro e exposição a luz.

Tabela 4 – Resultados entre os grupos e condições de claro e escuro

Parâmetro locomotor	Idade	Condição do ambiente	Valor p	Claro x Escuro	Grupo	Valor p
Latência primeiro episódio mov. (s)	5 dpf	Claro	< 0,048	Claro	DA Exp. luz ↓	< 0,009
	5 dpf	Escuro	< 0,002	Claro	SKF Exp. luz ↓	< 0,001
	7 dpf	Claro	0,460	Claro	DA Exp. luz ↑	< 0,009
	7 dpf	Escuro	< 0,001	Claro	SCH Exp. luz ↑	< 0,001
				Claro	ETI Exp. luz ↑	< 0,003
				Claro	SKF Exp. luz ↓	< 0,001
Episódio de movimento (nº)	5 dpf	Claro	0,131	Claro	SKF Exp. luz ↓	< 0,001
	5 dpf	Escuro	< 0,001	Claro	QUIN Exp. luz ↓	< 0,007
				Claro	SCH EXP. luz ↓	< 0,009
	7 dpf	Claro	0,059	Claro	DA EXP. luz ↓	< 0,001
	7 dpf	Escuro	< 0,002	Claro	QUIN Exp. luz ↓	< 0,023
				Claro	SCH Exp. luz ↓	p < 1,486E-017
				Claro	ETI Exp. luz ↓	< 0,001

Duração cumulativa episódio mov. (s)	5 dpf	Claro	< 0,039	Claro	SKF Exp. luz	↓	< 0,001
	5 dpf	Escuro	< 0,001	Claro	QUIN Exp. luz	↓	< 0,013
	7 dpf	Claro	<0,034	Claro	SCH Exp. luz	↓	< 0,001
	7 dpf	Escuro	< 0,001	Claro	DA Exp. luz	↓	< 0,001
				Claro	SCH Exp. luz	↓	< 0,001
				Claro	ETI Exp. luz	↓	< 0,001
				Claro	SKF Exp. luz	↓	< 0,002
				Claro	QUIN Exp. luz	↓	< 0,004

Distância total percorrida (cm)	5 dpf	Claro	0,210	Claro	SKF Exp. luz	↓	< 0,001
	5 dpf	Escuro	< 0,001	Claro	QUIN Exp. luz	↓	< 0,001
					SCH Exp. luz	↓	< 0,000003
					ETI Exp. luz	↓	< 0,011
					DA Exp. luz	↓	< 0,001
	7 dpf	Claro	0,054	Claro	SKF Exp. luz	↑	< 0,002
	7 dpf	Escuro	< 0,001	Claro	SCH Exp. luz	↓	< 0,001
					DA Exp. luz	↓	< 0,001
					QUIN Exp. luz	↓	< 0,002
					ETI Exp. luz	↓	< 0,001

Velocidade média (cm/s)	5 dpf	Claro	0,448	Claro	QUIN Exp. luz	↓	< 0,001
	5 dpf	Escuro	< 0,001	Claro	SCH Exp. luz	↓	p < 0,000006 57
				Claro	DA Exp. luz	↓	< 0,001
				Claro	SKF Exp. luz	↓	< 0,001
	7 dpf	Claro	< 0,010	Claro	ETI Exp. luz	↓	< 0,001
	7 dpf	Escuro	< 0,001	Claro	DA Exp. luz	↓	< 0,001
				Claro	SKF Exp. luz	↓	< 0,002
				Claro	QUIN Exp. luz	↓	< 0,003
				Claro	SCH Exp. luz	↓	< 0,001

Tabela 4 – Tabela de resultados entre os grupos tratados para ambas idades de 5 e 7 dpf na condição de claro e escuro.

7 DISCUSSÃO

Em um trabalho anterior do nosso grupo demonstraram que a exposição das larvas à dopamina e ao agonista dopaminérgico para os receptores do D2, durante a janela desenvolvimental de 3-5 dpf, reduz tanto o número de neurônios GABAérgicos quanto o número de movimentos iniciados em larvas com 5 dpf (SOUZA; ROMANO-SILVA; TROPEPE, 2011). Em outro trabalho, foi observado que a redução dos níveis de DARPP-32 nas larvas através de morpholinos também reduzem o número de neurônios GABAérgicos e do número de comportamentos iniciados (Souza et al. Submetido). Em um trabalho recente, foi observado novamente que a exposição à dopamina na mesma janela desenvolvimental reduz parâmetros do comportamento motor, os quais se mantêm alterados até o 14 dpf (DE SOUZA LIMA *et al.*, 2020). O objetivo deste trabalho foi investigar o papel dos receptores D1 e D2, na janela

desenvolvimental 3 a 5 dpf, no desenvolvimento do comportamento motor das larvas de zebrafish. Avaliamos diversos parâmetros do comportamento motor como distância total percorrida, velocidade média, número de movimentos iniciados, latência para o primeiro episódio de movimento iniciado e duração cumulativa dos episódios de movimentos exibidos. Também investigamos o comportamento motor no claro e no escuro. Em seguida, avaliamos se os parâmetros observados persistiriam até a idade de 7 dpf.

Inicialmente, testamos se a luminosidade (ambiente claro ou escuro) teria influência no comportamento motor. É sabido que larvas com 5 dpf reduzem a locomoção nas condições de exposição à luz e aumentam gradativamente. Na idade entre 7 e 14 dpf, elas exibem fototaxia a luz e aumentam a locomoção durante o estímulo luminoso, em decorrência da resposta exploratória a medida que os animais avançam no desenvolvimento (BROCKERHOFF *et al.*, 1995; ORGER; BAIER, 2005).

De acordo com nossos resultados, encontramos uma diferença em todos os grupos observados em todos os parâmetros avaliados em ambas idades de 5 e 7 dpf. Portanto, podemos concluir que o ambiente iluminado foi suficiente para alterar o comportamento motor das larvas, sugerindo alteração no comportamento motivacional principalmente para os animais na idade de 7 dpf, uma vez que o componente exploratório nessa idade desenvolvimental é requerido.

Em seguida, avaliamos a exposição aos agonistas ou antagonistas de D1 e D2 entre 3 e 5dpf alteraria o comportamento motor em larvas no claro. Observamos que para idade de 5 dpf, houve uma diferença entre os grupos DA e ETI no parâmetro de duração cumulativa de episódio de movimento. Já para a idade de 7 dpf, observamos uma diferença entre os grupos SKF e SCH no parâmetro de distância total percorrida e uma diferença entre os grupos tratados cronicamente com DA, SCH e SKF para a velocidade média. No entanto, nos demais parâmetros e idades avaliados, não encontramos nenhuma diferença estatística. Quando comparamos os grupos tratados em ambas condições de exposição a luz e ao escuro, encontramos uma diferença em diversos parâmetros motores, em que os animais tratados expostos ao estímulo luminoso apresentaram redução do comportamento motor em relação aos animais tratados no escuro. Nossos resultados são contrários aos trabalhos anteriores que sugerem que a claridade aumenta a atividade exploratória. É possível que um

fenômeno aversivo foi gerando na condição de exposição a luz, em sintonia com o congelamento exibido pelos animais durante todo período de análise. De acordo com essa observação, sugerimos que o tratamento com agentes farmacológicos de natureza ansiolíticas poderiam reverter o efeito e confirmar essas hipóteses. Ainda assim, discutimos também, a participação da formação do sistema visual do zebrafish, ao passo que o sistema catecolaminérgico é altamente preservado em relação aos mamíferos (TAY *et al.*, 2011). Portanto, é possível que durante o tratamento ocorreram alterações na formação do circuito visual induzindo respostas distintas durante o estímulo luminoso.

De acordo com nossos resultados, foi possível observar que as larvas expostas aos agonistas e antagonistas dopaminérgicos exibiram alterações motoras na condição de escuro, predominantemente na idade de 5 dpf. Dessa forma, podemos inferir que as alterações no comportamento motor da larva aos 5 dpf ocorre através da mudança de disponibilidade de receptores e uma possível alteração na formação de circuitos, uma vez que o estímulo foi realizado durante a formação do sistema dopaminérgico estabelecido aproximadamente em 5 dpf (SCHWEITZER; DRIEVER, 2009; TAY *et al.*, 2011; HAEHNEL-TAGUCHI *et al.*, 2018). Ainda assim, esse achado corroboram com resultados encontrados por nosso grupo, demonstrando a influência da dopamina na redução do número de episódios de movimentos iniciados e neurônios GABAérgicos (SOUZA; ROMANO-SILVA; TROPEPE, 2011), distância total percorrida, velocidade média e tempo em movimento/por episódio de movimento durante 5 min e 30 min em larvas com 5 dpf quando tratadas com quinpirole e dopamina (DE SOUZA LIMA *et al.*, 2020).

Ao avaliarmos os comportamentos nos parâmetros isolados no escuro, observamos que para a latência do primeiro episódio de movimento no escuro, houve uma redução no tempo para o início do movimento do grupo SCH em relação ao grupo ETI, sugerindo uma participação antagônica dos receptores tipo-D2 em relação aos receptores tipo-D1, inferindo que, para o início do movimento, a influência da dopamina sob os receptores tipo-D1 é requerida. Somado a isso, houve também, uma diferença do grupo SCH em relação ao controle e o grupo SKF, o que poderia corresponder que, durante o tratamento crônico, a privação da dopamina endógena aos receptores D1, gerou indisponibilidade desses receptores, que após a lavagem, a

atividade responsiva à dopamina reduziu consideravelmente a latência para o primeiro episódio de movimento. Seguidamente, quando avaliamos o número de episódios de movimento exibido por larvas com 5 dpf no escuro, observamos que a redução do grupo e ETI em relação ao CRTL e DA, revela novamente a participação dos receptores tipo-D2 no número de episódios de movimento exibidos pela larva. Além disso, a redução entre os grupos QUIN e SKF sugere que durante essa janela desenvolvimental existe maior densidade de receptores tipo-D2 ao passo que o tratamento crônico com ambos agonistas e antagonista foram mais responsivos para essa classe de receptores. Portanto, métodos de biotilação de receptores poderão confirmar essas hipóteses.

A duração cumulativa dos episódios de movimento consiste no tempo gasto em segundos por cada animal entre o início de um episódio e o fim. De acordo esse parâmetro, a diferença observada na redução da duração cumulativa dos episódios de movimento exibida pelo grupo ETI em relação aos grupos QUIN e SCH demonstra a consistência de ausência dos receptores tipo-D2 para a manutenção no aumento do comportamento motor. Somado a isso, observamos também uma diferença entre os grupos SKF e CRTL em relação ao grupo QUIN. Contudo, esse parâmetro revela uma importante diferença na velocidade entre um episódio de movimento e o seu fim, ao passo que o grupo ETI exibe um aumento na velocidade entre os episódios quando avaliado a duração cumulativa. Isso sugere que, apesar da redução do controle motor mediado pelos receptores tipo-D2 quanto ao número de episódios de movimento, a participação desse mecanismo é requerida para sustentar a velocidade entre um episódio e outro. Entretanto, ao avaliamos a velocidade média percorrida pelas larvas com 5 dpf no escuro, observamos que houve uma redução do grupo ETI comparado SCH e a mesma redução também foi observada para os grupos QUIN comparado ao SKF, novamente demonstrando a participação dos receptores tipo-D2 e a participação dessa classe para sustentar a velocidade média avaliada dentro do tempo total percorrido. Outro parâmetro que corrobora com esses resultados, e a distância total percorrida, ao passo que o grupo DA reduziu a distância total em relação ao controle, e o grupo ETI exibiu novamente redução entre os grupos SCH e CRTL, e o grupo QUIN em relação ao SKF e CRTL. De fato, esse parâmetro tem sido reportado em trabalhos do nosso grupo, demonstrando que durante a estimulação aguda (5 min) e crônica (48h) com dopamina e quinpirole induziram redução do comportamento motor,

quando avaliado a distância total percorrida, em 42% e 34% respectivamente (LIMA et al., 2020).

Outros trabalhos têm reportado um efeito antagônico comparado aos nossos resultados mediados pelos receptores tipo-D2, nesse mesmo parâmetro avaliado, o tratamento com quinpirole em doses entre 5 uM e 16uM, gera hiperatividade de forma dose dependente nas condições de claro e escuro na idade de 6 dpf quando administrada de forma aguda (IRONS *et al.*, 2013). Porém, é importante ressaltar que na idade de 6 dpf existe uma completa formação do sistema dopaminérgico, que possivelmente gera um balanço excitatório e inibitório que modulam esses efeitos. Em contraste, nossos resultados demonstram a estimulação durante a gênese do sistema dopaminérgico e ampliam a participação dos receptores tipo-D2 até a fase final de formação na idade de 5 dpf. Além disso, a redução observada no grupo tratado cronicamente com o quinpirole (SÓVÁGÓ *et al.*, 2005) permite discutir a possível existência das isoformas dos receptores D₂ presentes nessa idade de formação e podem contribuir para geração na redução de dopamina, uma vez que a ativação dessa isoforma nos terminais pré sinápticos inibem a liberação desse neurotransmissor (MISSALE *et al.*, 1998; VAN DER WEIDE *et al.*, 1988). Porém, trabalhos subsequentes a fim de verificar a presença dessas isoformas em ambos terminais sinápticos no zebrafish são requeridos. De outra forma, a redução da locomoção com estímulo de quinpirole pode ser atribuída a redução de segundos mensageiros mediados pela inibição da AC (MISSALE *et al.*, 1998). Somado a isso, a desfosforilação da proteína Akt no resíduo Thr308 e GSK3 β na larva em 5 dpf concomitante a redução no número de episódios de movimento quando tratadas com quinpirole (SOUZA; ROMANO-SILVA; TROPEPE, 2011). Outro fator importante a considerar é a participação dos receptores D₃. Kolasiewicz e colaboradores (2008), demonstraram redução da distância total percorrida em ratos tratados com agonista seletivo para esse receptor de forma dose dependente, sendo assim, é possível que atividade do quinpirole também atinge o mecanismo funcional dos receptores D₃ e contribuem para a redução do comportamento motor (KOLASIEWICZ; MAJ; OSSOWSKA, 2008).

A respeito da redução mediada pelos antagonistas dos receptores tipo-D2 tem sido bem caracterizada. Antagonistas de outra natureza exercem alterações na

redução do comportamento motor em diversos modelos experimentais (CHOI *et al.*, 2009; KING; BURKE; LUCAS, 1995). Irons e colaboradores (2013) demonstraram que o estímulo com haloperidol em larvas com 6 dpf (antagonistas tipo-D2) em doses intermediárias induzem hipolocomoção na distância total percorrida no escuro de forma dose dependente, e o efeito é completamente abolido em doses elevadas (IRONS *et al.*, 2013). Adicionalmente, o tratamento com antagonista para receptores tipo-D2 não seletivo (butaclamol) induziram os mesmos efeitos comparados ao haloperidol (IRONS *et al.*, 2013). Em outro trabalho, o estímulo com d-anfetamina em larvas com 5 dpf induziram efeitos bifásicos de aumento e diminuição da locomoção de forma dose dependente e somente hipolocomoção quando tratadas com cocaína de forma dose dependente (IRONS *et al.*, 2010). Entretanto, em um trabalho recente, Oliveri e colaboradores (2019) demonstraram que em pequenas doses com haloperidol ocorre uma hiperatividade em larvas com 6 dpf tratadas a partir de 5 hpf a 5 dpf. Contudo, neste trabalho, foram avaliadas linhagens distintas (AB* e 5D). As linhagens originais A e B geram embriões haploides que são submetidos ao cruzamento com machos não selecionados para formação do genótipo AB*, esses cruzamentos são importantes para reduzir a taxa de mortalidade a partir de mutações distintas (VAN SLYKE *et al.*, 2018). As cepas descritas como 5D, são geradas a partir do cruzamento de cepas selvagens com escalonamento de desova para garantir a viabilidade dos embriões (MB; RL; A, 2017), por tanto, ambas cepas apresentam variabilidade distintas de acordo com a aplicação experimental, sendo assim, é possível que variantes genéticas de desenvolvimento entre as espécies corroboram com alterações distintas entre as ferramentas farmacológicas utilizadas, ao passo que foi possível observar diferença entre as cepas na condição de escuro, gerando a emergência de distintos fenômenos farmacodinâmicos (RIHEL *et al.*, 2010). De forma geral, é importante ressaltar que o haloperidol não exibe a seletividade precisa para os receptores D2, podendo bloquear a atividade dos receptores $\alpha 1$ adrenérgicos (RICHELSON; SOUDER, 2000). Além disso, outras ferramentas farmacológicas como agonistas e antagonistas não seletivos podem gerar efeitos distintos dos resultados demonstrados nos trabalhos citados quando comparados a dopamina.

De acordo com nossos resultados, suscitamos que os mecanismos intracelulares mediados pelos receptores D₂ via Akt, exerce maior sensibilidade quando tratados com antagonistas. Sendo assim, a ativação da Akt via inibição dos

receptores tipo-D2 quando tratados com eticloprida, gerou uma redução da atividade de GSK-3 β (BEAULIEU, J.-M. *et al.*, 2004), podendo compor a redução do comportamento motor. Além disso, a ativação permanente desse complexo pode gerar internalização seguida de acúmulo proteico tornado suscetível a atividade do complexo sistema ubiquitina proteossoma, tornado previsível a degradação desses receptores (MCNAUGHT *et al.*, 2002) e a consequente perda do comportamento motor.

Baseado nos nossos resultados, discutimos também que a privação da dopamina sobre os receptores do tipo-D2 gerou um *input* dopaminérgico sobre os receptores do tipo-D1, e a ativação do complexo β -arrestina e a consequente internalização dos receptores dessa família (BEAULIEU; GAINETE NOV, 2011). Portanto, para sustentar essa hipótese, sugerimos um bloqueio parcial de tirosina hidroxilase, ao passo que a redução na síntese de dopamina endógena poderá gerar uma resposta basal, observando somente o bloqueio dos receptores tipo-D2, sem a uma possível influência da dopamina aos receptores tipo-D1.

Em contraste, não observamos alteração nos parâmetros motores quando avaliamos o tratamento somente com SKF-38393. Em contraste, Irons e colaboradores (2013) demonstraram que a estimulação aguda com SKF-38393 e apomorfina (agonista não seletivo) induz um aumento na distância total percorrida no escuro somente em altas doses na idade de 6 dpf. Por tanto, para nossas análises, a ausência de resposta motora observada com SKF-38393 foi possível em decorrência da dose aplicada durante essa idade desenvolvimental.

Para verificar se os tratamentos podem alterar os comportamentos à medida que os animais avançam no desenvolvimento, avaliamos as respostas na idade de 7 dpf no escuro. A latência para o primeiro episódio de movimento exibiu um aumento considerável entre os grupos SKF e QUIN em relação aos demais grupos tratados e CTRL. Isso ressalta que o durante o tratamento crônico com agonistas de ambas famílias no período de 3-5 dpf gerou um desbalanço na disposição dos receptores e a diferença apareceu somente em estágios mais avançados para o grupo SKF, enquanto o grupo tratado cronicamente com QUIN se manteve em diversos parâmetros avaliados, sugerindo que as alterações geradas a partir do estímulo aos receptores do tipo-D2 foram mais sensíveis e permanecem em estágios mais

avançados.

Quanto ao número de episódios de movimento exibidos pela larva, não foi possível notar diferença estatística entre os grupos, tanto QUIN quanto o grupo SKF se manterão reduzidos e uma aparente recuperação entre os grupos DA, SCH, e ETI. Interessantemente, quando avaliamos a duração cumulativa dos episódios de movimento, observamos que houve um aumento nesse parâmetro para os grupos QUIN e SKF em relação aos grupos SCH, DA e ETI, demonstrando a redução entre o início de um episódio de movimento e o seu fim. Discutimos nesse ponto que, à medida que os animais avançam no desenvolvimento, a necessidade exploratória aumente. Entretanto, a possível alteração observada no circuito durante o tratamento crônico entre 3-5 dpf não permite que os animais exibem essa resposta na idade de 7 dpf, pelo fato da não sustentação nos demais parâmetros motores observados para ambos os grupos QUIN e SKF. Quanto a distância total percorrida, a diferença observada para os grupos QUIN e SKF compõem a permanência na redução do comportamento motor, especialmente para o grupo QUIN, corroborando a sensibilidade dos receptores tipo-D2, e ressalta a não recuperação comparado aos demais grupos tratados SCH, DA e ETI. O mesmo é possível observar na velocidade média, demonstrando a permanência da redução dos grupos QUIN e SKF em relação aos demais grupos tratados. Além disso, a mesma resposta observada na idade de 5 dpf entre a velocidade dos episódios de movimento e a velocidade de movimento no tempo total percorrido, se manteve na idade de 7 dpf especialmente para o grupo QUIN.

De maneira geral, a resposta entre os grupos na mesma idade e comparado ao avanço no desenvolvimento gera uma série de análises interessantes sobre a disposição dos receptores. Baseado nesses achados e de acordo com a literatura, a ausência de resposta nos grupos tratados com SKF-38393 na idade de 5 dpf sugere uma densidade reduzida durante a fase de desenvolvimento entre 3-5 dpf, baseado na diferença observada em 7 dpf em todos os parâmetros observados no escuro. Ao mesmo tempo, a resposta entre os grupos tratados com DA, QUI e ETI na idade de 5 dpf sugere uma densidade maciça dos receptores tipo-D2. Sendo assim, é previsível que em estágios mais tardios, a presença dos receptores tipo-D1 se tornam mais responsivas a dopamina, compondo a diferença entre os grupos, levando em conta a

perda e ou alterações nos circuitos de formação mediados pela alta sensibilidade dos receptores tipo-D2, permitindo que as atividades endógenas da dopamina atuam sobre os receptores da classe oposta.

De outra forma, a sinalização de dopamina tem um papel fundamental na migração e diferenciação de neurônios GABAérgicos em direção ao telencéfalo e ao córtex pré-frontal em mamíferos durante a formação do cérebro (CRANDALL, 2004), (CRANDALL *et al.*, 2007). Sendo assim, é previsível que o estímulo induzido durante a gênese do sistema dopaminérgico conduziu uma diminuição de neurônios GABAérgicos em 5 dpf alterando a formação de outros circuitos requeridos para o controle motor em estágios mais avançados, o mesmo foi demonstrado no trabalho realizado por Souza *et al.* (2011). Somado a isso, Oishi e colaboradores (2009), demonstraram em um elegante trabalho em mamíferos a influência direta da Akt sobre a diferenciação de células precursoras de neurônios telencefálicos contendo GABA mas não glutamato, corroborando com fenômenos essenciais mediados pela atividade dos receptores D2 dependentes de Akt. De acordo com esses achados, é fundamental ressaltar o papel da dopamina sobre a migração e diferenciação de neurônios de outra natureza durante a sinalização iniciada em 18 hpf na larva de zebrafish (SCHWEITZER; DRIEVER, 2009), sobretudo os grupamentos de neurônios DC 2, 4, 5 e 6 que migram em direção ao rombencéfalo, compondo a via semelhante à nigroestriatal e mesolímbica em mamíferos requeridas para controle motor e motivação. Portanto, para ampliar as questões aqui levantadas, são necessários mais trabalhos para verificar essas hipóteses. Finalmente, essas questões irão guiar de forma clara e mais objetiva a funcionalização dos receptores de dopamina durante a formação do cérebro na larva de zebrafish e o aperfeiçoamento do modelo experimental para estudos neurodesenvolvimentais.

8 CONCLUSÃO

Por fim, com base nos nossos achados, concluímos que alterações na sinalização de receptores dopaminérgicos na formação do cérebro gera alterações comportamentais diversas que podem ser permanentes em estágios desenvolvimentais mais tardios, especialmente a sinalização mediada pelos receptores tipo-D2. Concluímos também que as alterações observadas no

comportamento motor são dependentes das condições de claridade durante o teste, sendo importante o controle dessas condições em futuros trabalhos.

9 REFERÊNCIAS

ALBERT, Katherine A. *et al.* Evidence for Decreased DARPP-32 in the Prefrontal Cortex of Patients With Schizophrenia. **Archives of General Psychiatry**, v. 59, n. 8, p. 705–712, 1 ago. 2002. DOI 10.1001/archpsyc.59.8.705. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jamapsychiatry/fullarticle/206592>. Acesso em: 21 jan. 2020.

ALBERT, Paul R. *et al.* Coupling of a cloned rat dopamine-D2 receptor to inhibition of adenylyl cyclase and prolactin secretion. **The Journal of biological chemistry**, v. 265, n. 4, p. 2098–2104, 1990.

ANDERSON, S. A. *et al.* Interneuron migration from basal forebrain to neocortex: dependence on Dlx genes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 278, n. 5337, p. 474–476, 17 out. 1997. DOI 10.1126/science.278.5337.474.

ARAKI, Kiyomi Y. *et al.* Characterization of mouse striatal precursor cell lines expressing functional dopamine receptors. **Developmental Neuroscience**, v. 28, n. 6, p. 518–527, 2006. DOI 10.1159/000095114.

BARBEAU, A. L-dopa therapy in Parkinson's disease: a critical review of nine years' experience. **Canadian Medical Association Journal**, v. 101, n. 13, p. 59–68, 27 dez. 1969.

BASNET, Ram Manohar *et al.* Zebrafish Larvae as a Behavioral Model in Neuropharmacology. **Biomedicines**, v. 7, n. 1, 26 mar. 2019. DOI 10.3390/biomedicines7010023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6465999/>. Acesso em: 2 dez. 2019.

BEAULIEU, Jean-Martin *et al.* An Akt/ β -Arrestin 2/PP2A Signaling Complex Mediates Dopaminergic Neurotransmission and Behavior. **Cell**, v. 122, n. 2, p. 261–273, jul. 2005a. DOI 10.1016/j.cell.2005.05.012. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867405004575>. Acesso em: 21 jan. 2020.

BEAULIEU, Jean-Martin; GAINETDINOV, Raul R. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 1, p.

182–217, mar. 2011. DOI 10.1124/pr.110.002642. Disponível em: <http://pharmrev.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/pr.110.002642>. Acesso em: 6 nov. 2019.

BEAULIEU, J.-M. *et al.* Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 14, p. 5099–5104, 6 abr. 2004. DOI 10.1073/pnas.0307921101. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0307921101>. Acesso em: 8 jan. 2020.

BENES, F. Emerging principles of altered neural circuitry in schizophrenia. **Brain Research Reviews**, v. 31, n. 2–3, p. 251–269, mar. 2000. DOI 10.1016/S0165-0173(99)00041-7. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165017399000417>. Acesso em: 21 jan. 2020.

BIBB, J. A. *et al.* Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. **Nature**, v. 402, n. 6762, p. 669–671, 9 dez. 1999. DOI 10.1038/45251.

BJÖRKLUND, Anders; DUNNETT, Stephen B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 5, p. 194–202, maio 2007. DOI 10.1016/j.tins.2007.03.006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223607000677>. Acesso em: 6 nov. 2019.

BJÖRKLUND, Anders; FALCK, Bengt; STENEVI, Ulf. Microspectrofluorimetric Characterization of Monoamines in the Central Nervous System: Evidence for a New Neuronal Monoamine-like Compound. *In*: ERÄNKÖ, Olavi (org.). **Progress in Brain Research**. [s.l.]: Elsevier, 1971. v. 34. p. 63–73. DOI 10.1016/S0079-6123(08)63954-0. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612308639540>. Acesso em: 6 fev. 2020.

BLOOM, David E *et al.* The Economic Burden of Chronic Diseases: Estimates and Projections for China, Japan, and South Korea The Economic Burden of Chronic

Diseases: Estimates and Projections for China, Japan, and South Korea. 2017. DOI 10.13140/RG.2.2.32306.91840. Disponível em: <http://rgdoi.net/10.13140/RG.2.2.32306.91840>. Acesso em: 21 jan. 2020.

BOEHMLER, W. *et al.* D4 Dopamine receptor genes of zebrafish and effects of the antipsychotic clozapine on larval swimming behaviour. **Genes, Brain and Behavior**, v. 6, n. 2, p. 155–166, mar. 2007. DOI 10.1111/j.1601-183X.2006.00243.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1601-183X.2006.00243.x>. Acesso em: 4 nov. 2019.

BOEHMLER, Wendy *et al.* Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 230, n. 3, p. 481–493, jul. 2004. DOI 10.1002/dvdy.20075. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/dvdy.20075>. Acesso em: 4 nov. 2019.

BROCKERHOFF, S. E. *et al.* A behavioral screen for isolating zebrafish mutants with visual system defects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 23, p. 10545–10549, 7 nov. 1995. DOI 10.1073/pnas.92.23.10545. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.92.23.10545>. Acesso em: 2 dez. 2019.

BURGESS, H. A.; GRANATO, M. Modulation of locomotor activity in larval zebrafish during light adaptation. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, n. 14, p. 2526–2539, 15 jul. 2007. DOI 10.1242/jeb.003939. Disponível em: <http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.003939>. Acesso em: 2 dez. 2019.

BURGESS, Harold A.; SCHOCH, Hannah; GRANATO, Michael. Distinct Retinal Pathways Drive Spatial Orientation Behaviors in Zebrafish Navigation. **Current Biology**, v. 20, n. 4, p. 381–386, fev. 2010. DOI 10.1016/j.cub.2010.01.022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982210000618>. Acesso em: 21 jan. 2020.

CANDY, Judith; COLLET, Chris. Two tyrosine hydroxylase genes in teleosts. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, v. 1727, n. 1, p. 35–44, 21 jan. 2005. DOI 10.1016/j.bbaexp.2005.11.005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167478104002593>. Acesso em: 21 jan. 2020.

CARLSSON, A. A Paradigm Shift in Brain Research. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1021–1024, 2 nov. 2001. DOI 10.1126/science.1066969. Disponível em: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1066969>. Acesso em: 21 jan. 2020.

CHEN, Yu-Chia; PRIYADARSHINI, Madhusmita; PANULA, Pertti. Complementary developmental expression of the two tyrosine hydroxylase transcripts in zebrafish. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 132, n. 4, p. 375–381, out. 2009. DOI 10.1007/s00418-009-0619-8. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00418-009-0619-8>. Acesso em: 24 out. 2019.

CHOI, Won Yung *et al.* Dopamine D1 and D2 antagonist effects on Response Likelihood and Duration. **Behavioral neuroscience**, v. 123, n. 6, p. 1279–1287, dez. 2009. DOI 10.1037/a0017702. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2821424/>. Acesso em: 22 nov. 2019.

COLLIER, Adam D.; ECHEVARRIA, David J. The utility of the zebrafish model in conditioned place preference to assess the rewarding effects of drugs. **Behavioural Pharmacology**, v. 24, n. 5–6, p. 375–383, set. 2013. DOI 10.1097/FBP.0b013e328363d14a.

COOLS, Roshan; D'ESPOSITO, Mark. Inverted-U-Shaped Dopamine Actions on Human Working Memory and Cognitive Control. **Biological Psychiatry**, v. 69, n. 12, p. e113–e125, jun. 2011. DOI 10.1016/j.biopsych.2011.03.028. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322311002782>. Acesso em: 21 jan. 2020.

COWAN, W. M. *et al.* Regressive events in neurogenesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 225, n. 4668, p. 1258–1265, 21 set. 1984. DOI 10.1126/science.6474175.

CRANDALL, J. E. Cocaine Exposure Decreases GABA Neuron Migration from the Ganglionic Eminence to the Cerebral Cortex in Embryonic Mice. **Cerebral Cortex**, v. 14, n. 6, p. 665–675, 14 abr. 2004. DOI 10.1093/cercor/bhh027. Disponível em: <https://academic.oup.com/cercor/article-lookup/doi/10.1093/cercor/bhh027>. Acesso em: 4 dez. 2019.

CRANDALL, J. E. *et al.* Dopamine Receptor Activation Modulates GABA Neuron Migration from the Basal Forebrain to the Cerebral Cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 14, p. 3813–3822, 4 abr. 2007. DOI 10.1523/JNEUROSCI.5124-06.2007. Disponível em: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.5124-06.2007>. Acesso em: 4 dez. 2019.

DE BOER, A.; VAN BUEL, E.M.; TER HORST, G.J. Love is more than just a kiss: a neurobiological perspective on love and affection. **Neuroscience**, v. 201, p. 114–124, jan. 2012. DOI 10.1016/j.neuroscience.2011.11.017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030645221101284X>. Acesso em: 21 jan. 2020.

DE SOUZA LIMA, Ana Carolina Monteiro *et al.* Impairment of motor but not anxiety-like behavior caused by the increase of dopamine during development is sustained in zebrafish larvae at later stages. **International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, 28 jan. 2020. DOI 10.1002/jdn.10009.

DEMCHYSHYN, Lidia L. *et al.* The Dopamine D1D Receptor: CLONING AND CHARACTERIZATION OF THREE PHARMACOLOGICALLY DISTINCT D1-LIKE RECEPTORS FROM *Gallus domesticus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 8, p. 4005–4012, 24 fev. 1995. DOI 10.1074/jbc.270.8.4005. Disponível em: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.270.8.4005>. Acesso em: 4 nov. 2019.

DIEHL, David J.; GERSHON, Samuel. The role of dopamine in mood disorders. **Comprehensive Psychiatry**, v. 33, n. 2, p. 115–120, 1 mar. 1992. DOI 10.1016/0010-440X(92)90007-D. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0010440X9290007D>. Acesso em: 21 jan. 2020.

FILIPPI, Alida *et al.* Expression of the paralogous tyrosine hydroxylase encoding genes *th1* and *th2* reveals the full complement of dopaminergic and noradrenergic neurons in zebrafish larval and juvenile brain. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 518, n. 4, p. 423–438, 15 fev. 2010. DOI 10.1002/cne.22213. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/cne.22213>. Acesso em: 3 dez. 2019.

FITZGERALD, Thomas H. B.; DOLAN, Raymond J.; FRISTON, Karl. Dopamine, reward learning, and active inference. **Frontiers in Computational Neuroscience**, v. 9, 4 nov. 2015. DOI 10.3389/fncom.2015.00136. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fncom.2015.00136/abstract>. Acesso em: 21 jan. 2020.

FOLGUEIRA, Mónica *et al.* Morphogenesis underlying the development of the everted teleost telencephalon. **Neural Development**, v. 7, n. 1, p. 32, 2012. DOI 10.1186/1749-8104-7-32. Disponível em: <http://neuraldevelopment.biomedcentral.com/articles/10.1186/1749-8104-7-32>. Acesso em: 7 nov. 2019.

FRIEDMAN, E.; YADIN, E.; WANG, H. Y. Effect of prenatal cocaine on dopamine receptor-G protein coupling in mesocortical regions of the rabbit brain. **Neuroscience**, v. 70, n. 3, p. 739–747, fev. 1996. DOI 10.1016/s0306-4522(96)83011-9.

FRIEDMANN, Drew *et al.* A spinal opsin controls early neural activity and drives a behavioral light response. **Current biology: CB**, v. 25, n. 1, p. 69–74, 5 jan. 2015. DOI 10.1016/j.cub.2014.10.055.

FRIEDRICH, Rainer W.; JACOBSON, Gilad A.; ZHU, Peixin. Circuit neuroscience in zebrafish. **Current biology: CB**, v. 20, n. 8, p. R371-381, 27 abr. 2010. DOI 10.1016/j.cub.2010.02.039.

FU, Cynthia H.Y.; FAN, Yong; DAVATZIKOS, Christos. Widespread Morphometric Abnormalities in Major Depression. **Neuroimaging Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 85–95, fev. 2020. DOI 10.1016/j.nic.2019.09.008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1052514919300875>. Acesso em: 21 jan. 2020.

GANZ, Julia *et al.* Subdivisions of the adult zebrafish subpallium by molecular marker analysis. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 520, n. 3, p. 633–655, 15 fev. 2012. DOI 10.1002/cne.22757.

GARLAND, Emily M.; BIAGGIONI, Italo. Dopamine Beta-Hydroxylase Deficiency. *In*: ADAM, Margaret P. *et al.* (org.). **GeneReviews®**. Seattle (WA): University of

Washington, Seattle, 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1474/>. Acesso em: 21 jan. 2020.

GARRIGA, Marina *et al.* Efficacy of quetiapine XR vs. placebo as concomitant treatment to mood stabilizers in the control of subthreshold symptoms of bipolar disorder: Results from a pilot, randomized controlled trial. **European Neuropsychopharmacology**, v. 27, n. 10, p. 959–969, out. 2017. DOI 10.1016/j.euroneuro.2017.08.429. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924977X17308969>. Acesso em: 21 jan. 2020.

GIRAULT, J. A. *et al.* Phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, by casein kinase II. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 36, p. 21748–21759, 25 dez. 1989. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/264/36/21748>. Acesso em: 21 jan. 2020.

GIROS, B. *et al.* Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. **Nature**, v. 342, n. 6252, p. 923–926, 21 dez. 1989. DOI 10.1038/342923a0.

GLÜCKSMANN, A. CELL DEATHS IN NORMAL VERTEBRATE ONTOGENY. **Biological Reviews**, v. 26, n. 1, p. 59–86, fev. 1951. DOI 10.1111/j.1469-185X.1951.tb00774.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-185X.1951.tb00774.x>. Acesso em: 21 jan. 2020.

GRUNWALD, David Jonah; EISEN, Judith S. Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate. **Nature Reviews. Genetics**, v. 3, n. 9, p. 717–724, 2002. DOI 10.1038/nrg892.

GUDELSKY, G. A. *et al.* Activity of tuberoinfundibular dopaminergic neurons and concentrations of serum prolactin in the rat following lithium administration. **Psychopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 92–96, 1 mar. 1988. DOI 10.1007/BF00735887. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00735887>. Acesso em: 21 jan. 2020.

HAEHNEL-TAGUCHI, Melanie *et al.* Projections of the Diencephalospinal Dopaminergic System to Peripheral Sense Organs in Larval Zebrafish (*Danio rerio*).

Frontiers in Neuroanatomy, v. 12, p. 20, 19 mar. 2018. DOI 10.3389/fnana.2018.00020. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2018.00020/full>. Acesso em: 2 dez. 2019.

HARVEY, John; HEINBOCKEL, Thomas. Neuromodulation of Synaptic Transmission in the Main Olfactory Bulb. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 10, p. 2194, 8 out. 2018. DOI 10.3390/ijerph15102194. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1660-4601/15/10/2194>. Acesso em: 21 jan. 2020.

HIRANO, J.; ARCHER, S. N.; DJAMGOZ, M. B. Dopamine receptor subtypes expressed in vertebrate (carp and eel) retinae: cloning, sequencing and comparison of five D1-like and three D2-like receptors. **Receptors & Channels**, v. 5, n. 6, p. 387–404, 1998.

HOWE, Kerstin *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, abr. 2013. DOI 10.1038/nature12111. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature12111>. Acesso em: 22 out. 2019.

IRONS, T.D. *et al.* Acute administration of dopaminergic drugs has differential effects on locomotion in larval zebrafish. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 103, n. 4, p. 792–813, fev. 2013. DOI 10.1016/j.pbb.2012.12.010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091305712003346>. Acesso em: 21 nov. 2019.

IRONS, T.D. *et al.* Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 32, n. 1, p. 84–90, jan. 2010. DOI 10.1016/j.ntt.2009.04.066. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0892036209001317>. Acesso em: 2 dez. 2019.

IVERSEN, Susan D.; IVERSEN, Leslie L. Dopamine: 50 years in perspective. **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 5, p. 188–193, maio 2007. DOI 10.1016/j.tins.2007.03.002. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223607000495>. Acesso em: 21 jan. 2020.

K. SHIN, J. *et al.* Schizophrenia: A Systematic Review of the Disease State, Current Therapeutics and their Molecular Mechanisms of Action. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 9, p. 1380–1404, 1 mar. 2011. DOI 10.2174/092986711795029546. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=18&issue=9&spage=1380>. Acesso em: 6 nov. 2019.

KEBABIAN, John W.; CALNE, Donald B. Multiple receptors for dopamine. **Nature**, v. 277, n. 5692, p. 93–96, jan. 1979. DOI 10.1038/277093a0. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/277093a0>. Acesso em: 21 jan. 2020.

KESHELAVA, Amiran *et al.* High capacity in G protein-coupled receptor signaling. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 28 fev. 2018. DOI 10.1038/s41467-018-02868-y. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-02868-y>. Acesso em: 21 jan. 2020.

KIM, Douglas S.; FROELICK, Glenda J.; PALMITER, Richard D. Dopamine-dependent desensitization of dopaminergic signaling in the developing mouse striatum. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 22, p. 9841–9849, 15 nov. 2002.

KIMMEL, C. B. *et al.* Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, v. 203, n. 3, p. 253–310, jul. 1995. DOI 10.1002/aja.1002030302.

KING, D. J.; BURKE, M.; LUCAS, R. A. Antipsychotic drug-induced dysphoria. **The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science**, v. 167, n. 4, p. 480–482, out. 1995. DOI 10.1192/bjp.167.4.480.

KOLASIEWICZ, W.; MAJ, J.; OSSOWSKA, K. The involvement of cerebellar dopamine D3 receptors in locomotor activity of rats. **Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)**, v. 115, n. 5, p. 677–681, maio 2008. DOI 10.1007/s00702-007-0009-0.

KUBIKOVA, Lubica; WADA, Kazuhiro; JARVIS, Erich D. Dopamine receptors in a songbird brain. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 518, n. 6, p. 741–769, 15 mar. 2010. DOI 10.1002/cne.22255. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2904815/>. Acesso em: 24 out. 2019.

LA MANNO, Gioele *et al.* Molecular Diversity of Midbrain Development in Mouse, Human, and Stem Cells. **Cell**, v. 167, n. 2, p. 566- 580.e19, 6 out. 2016. DOI 10.1016/j.cell.2016.09.027.

LANKFORD, K. L.; DEMELLO, F. G.; KLEIN, W. L. D1-type dopamine receptors inhibit growth cone motility in cultured retina neurons: evidence that neurotransmitters act as morphogenic growth regulators in the developing central nervous system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 12, p. 4567–4571, jun. 1988.

LEVANT, B. The D3 dopamine receptor: neurobiology and potential clinical relevance. **Pharmacological Reviews**, v. 49, n. 3, p. 231–252, set. 1997.

MA, PoKay M. Catecholaminergic systems in the zebrafish. IV. Organization and projection pattern of dopaminergic neurons in the diencephalon. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 460, n. 1, p. 13–37, 19 maio 2003. DOI 10.1002/cne.10544.

MAXIMINO, Caio *et al.* Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. **Behavioural Brain Research**, v. 214, n. 2, p. 157–171, 25 dez. 2010. DOI 10.1016/j.bbr.2010.05.031.

MB, Wasden; RL, Roberts; A, DeLaurier. Optimizing Sperm Collection Procedures in Zebrafish. **Journal of the South Carolina Academy of Science**, v. 15, n. 2, 1 jan. 2017. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/29950952>. Acesso em: 6 fev. 2020.

MCHUGH, Patrick C.; BUCKLEY, David A. The structure and function of the dopamine transporter and its role in CNS diseases. **Vitamins and Hormones**, v. 98, p. 339–369, 2015a. DOI 10.1016/bs.vh.2014.12.009.

MCNAUGHT, Kevin St P. *et al.* Impairment of the ubiquitin-proteasome system causes dopaminergic cell death and inclusion body formation in ventral mesencephalic cultures: Inhibition of proteolysis in dopaminergic neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 81, n. 2, p. 301–306, 20 abr. 2002. DOI 10.1046/j.1471-4159.2002.00821.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1471-4159.2002.00821.x>. Acesso em: 8 jan. 2020.

MERSON, Michael H.; BLACK, Robert E.; MILLS, Anne J. (Org.). **Global health: diseases, programs, systems, and policies**. 3rd ed ed. Burlington, MA: Jones & Bartlett Learning, 2012.

MILLER, Noam; GERLAI, Robert. Quantification of shoaling behaviour in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 184, n. 2, p. 157–166, dez. 2007. DOI 10.1016/j.bbr.2007.07.007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432807003579>. Acesso em: 21 jan. 2020.

MISSALE, Cristina *et al.* Dopamine Receptors: From Structure to Function. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 1, p. 189–225, 1 jan. 1998. DOI 10.1152/physrev.1998.78.1.189. Disponível em: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.1998.78.1.189>. Acesso em: 6 nov. 2019.

MONTI, Jaime M.; PANDI-PERUMAL, S. R.; CHOKROVERTY, S. (Org.). **Dopamine and Sleep**. Cham: Springer International Publishing, 2016. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-46437-4>. Acesso em: 21 jan. 2020.

MOUNTCASTLE, V. B. The columnar organization of the neocortex. **Brain: A Journal of Neurology**, v. 120 (Pt 4), p. 701–722, abr. 1997. DOI 10.1093/brain/120.4.701.

NISHI, A.; SNYDER, G. L.; GREENGARD, P. Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 17, n. 21, p. 8147–8155, 1 nov. 1997.

OHTANI, Nobuyo *et al.* Dopamine Modulates Cell Cycle in the Lateral Ganglionic Eminence. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 7, p. 2840–2850, 1 abr. 2003. DOI

10.1523/JNEUROSCI.23-07-02840.2003. Disponível em:
<https://www.jneurosci.org/content/23/7/2840>. Acesso em: 21 jan. 2020.

OISHI, Koji *et al.* Selective induction of neocortical GABAergic neurons by the PDK1-Akt pathway through activation of Mash1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 31, p. 13064–13069, 4 ago. 2009. DOI 10.1073/pnas.0808400106.

OLIVERI, Anthony N.; LEVIN, Edward D. Dopamine D1 and D2 receptor antagonism during development alters later behavior in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 356, p. 250–256, 1 jan. 2019. DOI 10.1016/j.bbr.2018.08.028. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432818304376>. Acesso em: 23 nov. 2019.

OPAZO, Juan C. *et al.* Evolution of dopamine receptors: phylogenetic evidence suggests a later origin of the DRD_{2l} and DRD_{4rs} dopamine receptor gene lineages. **PeerJ**, v. 6, p. e4593, 13 abr. 2018. DOI 10.7717/peerj.4593. Disponível em: <https://peerj.com/articles/4593>. Acesso em: 4 nov. 2019.

ORDWAY, Gregory A; SCHWARTZ, Michael A; FRAZER, Alan. **Brain Norepinephrine: Neurobiology and Therapeutics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511544156>. Acesso em: 21 jan. 2020.

ORGER, Michael B.; BAIER, Herwig. Channeling of red and green cone inputs to the zebrafish optomotor response. **Visual Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 275–281, maio 2005. DOI 10.1017/S0952523805223039. Disponível em: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0952523805223039/type/journal_article. Acesso em: 2 dez. 2019.

PANULA, P. *et al.* The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. **Neurobiology of Disease**, v. 40, n. 1, p. 46–57, out. 2010. DOI 10.1016/j.nbd.2010.05.010.

PASTERKAMP, R. Jeroen; SMIDT, Marten P.; BURBACH, Johannes Peter Henri (Org.). **Development and engineering of dopamine neurons**. New York, N.Y. :

Austin, Tex: Springer Science+Business Media ; Landes Bioscience, 2009. (Advances in experimental medicine and biology, v. 651).

POPOLO, Margherita; MCCARTHY, Deirdre M.; BHIDE, Pradeep G. Influence of dopamine on precursor cell proliferation and differentiation in the embryonic mouse telencephalon. **Developmental Neuroscience**, v. 26, n. 2–4, p. 229–244, ago. 2004. DOI 10.1159/000082140.

PRAKASH, N.; WURST, W. Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 63, n. 2, p. 187–206, 1 jan. 2006. DOI 10.1007/s00018-005-5387-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5387-6>. Acesso em: 21 jan. 2020.

PUGLISI-ALLEGRA, Stefano; VENTURA, Rossella. Prefrontal/accumbal catecholamine system processes emotionally driven attribution of motivational salience. **Reviews in the Neurosciences**, v. 23, n. 5–6, 1 jan. 2012. DOI 10.1515/revneuro-2012-0076. Disponível em: <https://www.degruyter.com/view/j/revneuro.2012.23.issue-5-6/revneuro-2012-0076/revneuro-2012-0076.xml>. Acesso em: 21 jan. 2020.

PURVES, D.; LICHTMAN, J. W. Elimination of synapses in the developing nervous system. **Science (New York, N.Y.)**, v. 210, n. 4466, p. 153–157, 10 out. 1980. DOI 10.1126/science.7414326.

PURVES, Dale (Org.). **Neuroscience**. Sixth edition ed. New York: Oxford University Press, 2018.

RICHELSON, Elliott; SOUDER, Terry. Binding of antipsychotic drugs to human brain receptors. **Life Sciences**, v. 68, n. 1, p. 29–39, nov. 2000. DOI 10.1016/S0024-3205(00)00911-5. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320500009115>. Acesso em: 21 nov. 2019.

RIHEL, Jason *et al.* Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 327, n. 5963, p. 348–351, 15 jan. 2010. DOI 10.1126/science.1183090.

RINK, E.; WULLIMANN, M. F. The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum). **Brain Research**, v. 889, n. 1–2, p. 316–330, 19 jan. 2001. DOI 10.1016/s0006-8993(00)03174-7.

RINK, Elke; WULLIMANN, Mario F. Connections of the ventral telencephalon and tyrosine hydroxylase distribution in the zebrafish brain (*Danio rerio*) lead to identification of an ascending dopaminergic system in a teleost. **Brain Research Bulletin**, v. 57, n. 3, p. 385–387, 1 fev. 2002. DOI 10.1016/S0361-9230(01)00696-7. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0361923001006967>. Acesso em: 21 jan. 2020.

RIVERA, A. *et al.* Cellular localization and distribution of dopamine D(4) receptors in the rat cerebral cortex and their relationship with the cortical dopaminergic and noradrenergic nerve terminal networks. **Neuroscience**, v. 155, n. 3, p. 997–1010, 26 ago. 2002. DOI 10.1016/j.neuroscience.2008.05.060.

ROBBINS, T.W.; ARNSTEN, A.F.T. The Neuropsychopharmacology of Fronto-Executive Function: Monoaminergic Modulation. **Annual Review of Neuroscience**, v. 32, n. 1, p. 267–287, jun. 2009. DOI 10.1146/annurev.neuro.051508.135535. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.neuro.051508.135535>. Acesso em: 21 jan. 2020.

RONDOU, Pieter; HAEGEMAN, Guy; VAN CRAENENBROECK, Kathleen. The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 67, n. 12, p. 1971–1986, jun. 2010. DOI 10.1007/s00018-010-0293-y.

RUGER, Jennifer Prah. Global health governance as shared health governance. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 66, n. 7, p. 653–661, jul. 2012. DOI 10.1136/jech.2009.101097. Disponível em: <http://jech.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jech.2009.101097>. Acesso em: 21 jan. 2020.

SAINT-AMANT, L.; DRAPEAU, P. Motoneuron activity patterns related to the earliest behavior of the zebrafish embryo. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 11, p. 3964–3972, 1 jun. 2000.

SCHATZBERG, Alan F.; NEMEROFF, Charles B. (Org.). **The American Psychiatric Publishing textbook of psychopharmacology**. 3rd ed ed. Washington, DC: American Psychiatric Pub, 2004.

SCHWEITZER, Jörn; DRIEVER, Wolfgang. Development of the Dopamine Systems in Zebrafish. *In*: PASTERKAMP, R. Jeroen; SMIDT, Marten P.; BURBACH, J. Peter H. (org.). **Development and Engineering of Dopamine Neurons**. New York, NY: Springer New York, 2009. v. 651. p. 1–14. DOI 10.1007/978-1-4419-0322-8_1. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-0322-8_1. Acesso em: 2 dez. 2019.

SEEMAN, P.; VAN TOL, H. H. Dopamine receptor pharmacology. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 15, n. 7, p. 264–270, jul. 1994. DOI 10.1016/0165-6147(94)90323-9.

SIBLEY, D. R.; MONSMA, F. J. Molecular biology of dopamine receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 13, n. 2, p. 61–69, fev. 1992. DOI 10.1016/0165-6147(92)90025-2.

SKAGERBERG, G.; LINDVALL, O. Organization of diencephalic dopamine neurones projecting to the spinal cord in the rat. **Brain Research**, v. 342, n. 2, p. 340–351, 9 set. 1985. DOI 10.1016/0006-8993(85)91134-5.

SMEETS, W. J.; GONZÁLEZ, A. Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. **Brain Research. Brain Research Reviews**, v. 33, n. 2–3, p. 308–379, set. 2000. DOI 10.1016/s0165-0173(00)00034-5.

SOKOLOFF, P. *et al.* The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders. **CNS & neurological disorders drug targets**, v. 5, n. 1, p. 25–43, fev. 2006. DOI 10.2174/187152706784111551.

SOUZA, B. R.; ROMANO-SILVA, M. A.; TROPEPE, V. Dopamine D2 Receptor Activity Modulates Akt Signaling and Alters GABAergic Neuron Development and Motor

Behavior in Zebrafish Larvae. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 14, p. 5512–5525, 6 abr. 2011. DOI 10.1523/JNEUROSCI.5548-10.2011. Disponível em: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.5548-10.2011>. Acesso em: 21 nov. 2019.

SOUZA, Bruno R. *et al.* Dopaminergic intracellular signal integrating proteins: relevance to schizophrenia. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 95–100, 2006.

SÓVÁGÓ, Judit *et al.* Autoradiographic mapping of dopamine-D2/D3 receptor stimulated [35S]GTPgammaS binding in the human brain. **The European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 1, p. 65–71, jul. 2005. DOI 10.1111/j.1460-9568.2005.04192.x.

SPANO, P. F.; GOVONI, S.; TRABUCCHI, M. Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. **Advances in Biochemical Psychopharmacology**, v. 19, p. 155–165, 1978.

SPENCE, Rowena *et al.* The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 83, n. 1, p. 13–34, fev. 2008. DOI 10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x.

STEINER, Heinz; FUCHS, Sara; ACCILI, Domenico. D3 Dopamine Receptor-Deficient Mouse: Evidence for Reduced Anxiety. **Physiology & Behavior**, v. 63, n. 1, p. 137–141, dez. 1997a. DOI 10.1016/S0031-9384(97)00430-7. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938497004307>. Acesso em: 21 jan. 2020.

SUGAMORI, K. S. *et al.* D1A, D1B, and D1C dopamine receptors from *Xenopus laevis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 22, p. 10536–10540, 25 out. 1994. DOI 10.1073/pnas.91.22.10536. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.91.22.10536>. Acesso em: 24 out. 2019.

SZABO, Steven T.; GOULD, Todd D.; MANJI, Hussein K. Neurotransmitters, Receptors, Signal Transduction, and Second Messengers in Psychiatric Disorders.

The American Psychiatric Publishing textbook of psychopharmacology, 3rd ed.
New York, NY, US: American Psychoanalytic Association, 2004. p. 3–52.

TAY, Tuan Leng *et al.* Comprehensive catecholaminergic projectome analysis reveals single-neuron integration of zebrafish ascending and descending dopaminergic systems. **Nature Communications**, v. 2, n. 1, p. 171, set. 2011. DOI 10.1038/ncomms1171. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ncomms1171>. Acesso em: 9 nov. 2019.

TODD, Richard D. Neural development is regulated by classical neurotransmitters: Dopamine D2 receptor stimulation enhances neurite outgrowth. **Biological Psychiatry**, v. 31, n. 8, p. 794–807, abr. 1992. DOI 10.1016/0006-3223(92)90311-M. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000632239290311M>. Acesso em: 21 jan. 2020.

TOMKINS, D. M.; SELLERS, E. M. Addiction and the brain: the role of neurotransmitters in the cause and treatment of drug dependence. **CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 164, n. 6, p. 817–821, 20 mar. 2001.

USIELLO, A. *et al.* Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 199–203, 9 nov. 2000. DOI 10.1038/35041572.

VALLONE, Daniela; PICETTI, Roberto; BORRELLI, Emiliana. Structure and function of dopamine receptors. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 1, p. 125–132, jan. 2000. DOI 10.1016/S0149-7634(99)00063-9. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763499000639>. Acesso em: 21 jan. 2020.

VAN DER WEIDE, Jan *et al.* The enantiomers of the D-2 dopamine receptor agonist N-0437 discriminate between pre- and postsynaptic dopamine receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 146, n. 2–3, p. 319–326, fev. 1988. DOI 10.1016/0014-2999(88)90309-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0014299988903093>. Acesso em: 22 nov. 2019.

VAN SLYKE, Ceri E. *et al.* Using ZFIN: Data Types, Organization, and Retrieval. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1757, p. 307–347, 2018. DOI 10.1007/978-1-4939-7737-6_11. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6319390/>. Acesso em: 6 fev. 2020.

VENKATESH, Byrappa *et al.* Elephant shark genome provides unique insights into gnathostome evolution. **Nature**, v. 505, n. 7482, p. 174–179, jan. 2014. DOI 10.1038/nature12826. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature12826>. Acesso em: 4 nov. 2019.

VIDAL, Pia M.; PACHECO, Rodrigo. Targeting the Dopaminergic System in Autoimmunity. **Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on Neuroimmune Pharmacology**, 19 jan. 2019a. DOI 10.1007/s11481-019-09834-5.

WATANABE, Akiyama. **Dopamine research advances**. New York: Nova Biomedical Books, 2008. Disponível em: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=252388>. Acesso em: 21 jan. 2020.

WILLIAMS, S. Widespread origin of the primate mesofrontal dopamine system. **Cerebral Cortex**, v. 8, n. 4, p. 321–345, 1 jun. 1998. DOI 10.1093/cercor/8.4.321. Disponível em: <https://academic.oup.com/cercor/article-lookup/doi/10.1093/cercor/8.4.321>. Acesso em: 21 jan. 2020.

WITKOVSKY, Paul; DEARRY, Allen. Chapter 10 Functional roles of dopamine in the vertebrate retina. **Progress in Retinal Research**, v. 11, p. 247–292, jan. 1991. DOI 10.1016/0278-4327(91)90031-V. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/027843279190031V>. Acesso em: 21 jan. 2020.

WOLF, Marina E.; ROTH, Robert H. Autoreceptor Regulation of Dopamine Synthesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 604, n. 1, p. 323–343, 1990. DOI 10.1111/j.1749-6632.1990.tb32003.x. Disponível em: <https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1749-6632.1990.tb32003.x>. Acesso em: 21 jan. 2020.

YAMAMOTO, Kei *et al.* Classification of Dopamine Receptor Genes in Vertebrates: Nine Subtypes in Osteichthyes. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 86, n. 3–4, p. 164–175, 2015. DOI 10.1159/000441550. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/441550>. Acesso em: 10 fev. 2020.

YAMAMOTO, Kei *et al.* Evolution of Dopamine Receptor Genes of the D1 Class in Vertebrates. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 833–843, abr. 2013a. DOI 10.1093/molbev/mss268. Disponível em: <https://academic.oup.com/mbe/article-lookup/doi/10.1093/molbev/mss268>. Acesso em: 24 out. 2019.

YU, Lili *et al.* Cognitive Aging in Zebrafish. **PLoS ONE**, v. 1, n. 1, 20 dez. 2006. DOI 10.1371/journal.pone.0000014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1762370/>. Acesso em: 21 jan. 2020.

ZIV, L. *et al.* An affective disorder in zebrafish with mutation of the glucocorticoid receptor. **Molecular Psychiatry**, v. 18, n. 6, p. 681–691, jun. 2013. DOI 10.1038/mp.2012.64.