

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA

VITOR BORTOLO DE REZENDE

Desenvolvimento de modelos animais  
alternativos para avaliação dos efeitos  
comportamentais e metabólicos de  
antipsicóticos

Belo Horizonte  
2013

VITOR BORTOLO DE REZENDE

Desenvolvimento de modelos animais alternativos para  
avaliação dos efeitos comportamentais e metabólicos de  
antipsicóticos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
da Universidade Federal de Minas Gerais para  
obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-  
graduação em Medicina Molecular

Orientador: Prof. Titular Dr. Marco Aurélio Romano Silva

Belo Horizonte  
2013

R467d Rezende, Vitor Bortolo de.  
Desenvolvimento de modelos animais alternativos para avaliação dos efeitos comportamentais e metabólicos de antipsicóticos [manuscrito]. / Vitor Bortolo de Rezende. -- Belo Horizonte: 2013.  
156f.: il.  
Orientador: Marco Aurélio Romano Silva.  
Área de concentração: Farmacologia.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Peixe-Zebra. 2. Caenorhabditis elegans. 3. Antipsicóticos. 4. Comportamento. 5. Metabolismo energético. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Silva, Marco Aurélio Romano. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título

NLM: QV 77.9



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Desenvolvimento de modelos animais alternativos para avaliação dos efeitos comportamentais e metabólicos de antipsicóticos**

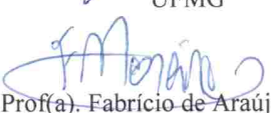
### VITOR BORTOLO DE REZENDE


Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA MOLECULAR, como requisito para obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, área de concentração MEDICINA MOLECULAR.


Aprovada em 28 de agosto de 2013, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof(a). Marco Aurelio Romano Silva - Orientador  
UFMG

  
Prof(a). Bruno Rezende de Souza  
UFMG

  
Prof(a). Fabricio de Araujo Moreira  
UFMG

  
Prof(a). Celio José de Castro Junior  
IEP-SANTA CASA

  
Prof(a). Liliam Midori Ide  
UFSJ

Belo Horizonte, 28 de agosto de 2013.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



## ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO VITOR BORTOLO DE REZENDE - 2009658862

Realizou-se, no dia 28 de agosto de 2013, às 13:30 horas, 526, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *Desenvolvimento de modelos animais alternativos para avaliação dos efeitos comportamentais e metabólicos de antipsicóticos*, apresentada por VITOR BORTOLO DE REZENDE, número de registro 2009658862, graduado no curso de CIENCIAS BIOLOGICAS/DIURNO, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Marco Aurelio Romano Silva - Orientador (UFMG), Prof(a). Bruno Rezende de Souza (UFMG), Prof(a). Fabrício de Araújo Moreira (UFMG), Prof(a). Célio José de Castro Junior (IEP-SANTA CASA), Prof(a). Liliam Midori Ide (UFSJ).

A Comissão considerou a tese:

- Aprovada  
 Aprovada condicionalmente, sujeita a alterações, conforme folha de modificações, anexa  
 Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.  
Belo Horizonte, 28 de agosto de 2013.

  
Prof(a). Marco Aurelio Romano Silva  
Doutor - UFMG

  
Prof(a). Bruno Rezende de Souza  
Doutor - UFMG

  
Prof(a). Fabrício de Araújo Moreira  
Doutor - USP

  
Prof(a). Célio José de Castro Junior  
Doutor - UFMG

  
Prof(a). Liliam Midori Ide  
Doutora - USP

CONFERE COM ORIGINAL  
Centro de Pós-Graduação  
Faculdade de Medicina - UFMG

***Aos meus pais,  
Guilherme e Lúcia***

## **Agradecimentos**

Agradeço, primeiramente, ao Prof. Marco Aurélio Romano-Silva, por ter me orientado ao longo desses anos. Sua ampla visão permitiu que eu aprendesse de tudo um pouco, de ciência básica a medicina.

À Dra. Karen Torres por ter sido a ponte pela qual entrei no laboratório e iniciei esta pesquisa. Obrigado por todos esses anos de amizade e colaboração científica, que se iniciou bem antes deste doutorado.

Ao Dr. Bruno Souza por ter sido a pessoa que me iniciou no modelo zebrafish, recebendo-me em Toronto, Canadá no final do ano de 2009. O conhecimento que foi me passado foi essencial para o desenvolvimento do modelo na Faculdade de Medicina – UFMG.

Ao Dr. Steve Farber que me recebeu tão bem no Carnegie Institution of Washington em Baltimore, USA no ano de 2011. Obrigado por toda experiência que me foi concedida no doutorado sanduíche.

Sem palavras para agradecer à Daniela Rosa, que todos conhecem como Dani. De fato, sem sua ajuda, esta tese não estaria da maneira como se encontra. A Dani sempre foi a pessoa mais disponível, nos melhores e nos piores momentos.

À Erika Kelmer, o pilar para que o modelo de zebrafish tenha funcionado tão bem. Além de minha amiga, foi uma das primeiras a abraçar o modelo zebrafish, passando por momentos que parecia que nada iria dar certo.

A Valquíria de Oliveira, iniciação científica que ajudou nos experimentos e na manutenção do biotério.

Ao António Alvim-Soares por ter sido amigo e um dos grande responsáveis por termos um biotério de peixes. Foi inestimável a sua disponibilidade em viajar cerca de 800 km em um dia para comprar as matrizes de zebrafish.

Ao amigo Manuel Schütze que sempre foi solícito em ajudar quando foi preciso. Obrigado pelo desenvolvimento e fabricação das caixas de comportamento.

Além dos que já foram citados acima, agradeço à todos os amigos feitos no laboratório: Cinthia Santana, Gabriel Aguiar, Priscila Gubert, Luciene Vieira, Célio de Casto Jr, Jessika Bridi, Elizete Pereira, Nancy Binda. Em especial, a experiência do doutorado teria sido totalmente sem graça não fosse o trio Luiz Alexandre Magno (Magno), Patrícia Pereira (Paty) e Simone Becho. Obrigado por todas conversas, viagens, almoços e festas compartilhadas.

Ao Prof. Dr. Marcus Vinícius Gomez, um dos pilares da neurociência no Brasil, pelas conversas animadas sobre ciência e assuntos diversos.

Ao Programa de Pós-Graduação de Medicina Molecular, juntamente com todos professores. Em especial à Dra. Débora Miranda e ao Dr. Luiz Armando de Marco.

À CAPES-INCT pela bolsa de doutorado e aos órgãos financiadores.

À Gisele Jünger por ter sido meu ponto de apoio ao longo desses anos. A vida teria sido muito mais difícil sem a sua presença.

À minha família: meus pais, Guilherme e Lúcia, que sempre me apoiaram nas minhas escolhas e me ensinaram a dar valor a educação e meus irmãos, Anita e Fernando, pelo companheirismo.



*“Cultiva a tua paixão pela ciência, diz ela, mas que tua ciência seja humana e tenha aplicação direta à ação e a sociedade. Quanto ao pensamento abstruso e às investigações profundas, eu os proíbo e os castigarei severamente com cismadora melancolia que eles provocam, com a interminável incerteza de que nunca te poderá livrar, e com a fria acolhida de que terão tuas pretensas descobertas quando quiseres comunicar. Sê filósofo, mas em meio de toda a tua filosofia, não te esqueças de ser homem.”*

David Hume

## Resumo

Embora a descoberta de fármacos psiquiátricos e o estudo de seus mecanismos de ação em mamíferos seja muito eficaz, essa estratégia é dificultada por fatores como a alta complexidade do organismo, o baixo escalonamento e o alto custo de manutenção. Portanto, modelos animais mais simples surgiram como alternativa devido à possibilidade de serem utilizados em experimentos de grande escala, ao baixo custo da criação e à menor complexidade em relação aos mamíferos. Dessa forma, o presente estudo propôs desenvolver novas estratégias para avaliar os efeitos de antipsicóticos utilizando dois modelos animais alternativos, o peixe teleósteo zebrafish (*Danio rerio*) e o verme nematódeo *Caenorhabditis elegans*. Em relação ao zebrafish como modelo, foram desenvolvidos testes para avaliar tanto o efeito metabólico de antipsicóticos atípicos quanto o efeito comportamental desses fármacos. Para estudar o efeito metabólico adverso, foi desenvolvido método para avaliar o efeito desses fármacos na absorção de vitelo pela larva de zebrafish utilizando sonda lipofílica fluorescente. Por outro lado, foram desenvolvidos três ensaios para avaliar os efeitos comportamentais utilizando larvas de zebrafish: agregação/dispersão de melanóforos, comportamento de flotação e atividade locomotora espontânea. Enquanto a avaliação da absorção de vitelo não conseguiu prever os efeitos metabólicos dos antipsicóticos atípicos, os testes comportamentais mostraram-se sensíveis ao efeito dos antipsicóticos. Os antipsicóticos clozapina e haloperidol mostraram-se capazes de dispersar os melanossomos dos melanóforos. Além disso, o comportamento de flotação foi induzido de forma intensa pelos antipsicóticos clozapina e risperidona, o que parece ser mediado parcialmente pelo antagonismo dos receptores de histamina H<sub>1</sub> e dopamina D<sub>2</sub>. Quanto ao efeito na atividade locomotora espontânea, o antipsicótico clozapina mostrou-se o mais eficaz na redução do deslocamento, seguido por risperidona e mepiramina. Em relação ao *C. elegans*, tentou-se desenvolver um modelo de comportamento social para avaliar o efeito do antipsicótico clozapina. Para tanto, foram escolhidas cepas que apresentam

comportamento social, como indicado pelo fenótipo de agregação. Clozapina mostrou-se capaz de inibir o comportamento social de *C. elegans* de maneira dose-dependente, indicando a possibilidade usar o modelo no estudo de outros fármacos. Portanto, os métodos desenvolvidos contribuem para o estudos dos efeitos comportamentais de antipsicóticos, sugerindo o uso de modelos alternativos como estratégia de estudo farmacológico.

**Palavras-chave:** zebrafish, *Danio rerio*, *Caenorhabditis elegans*, antipsicóticos, comportamento, metabolismo energético.

## Abstract

Although the discovery of psychiatric drugs and the study of their mechanisms of action in mammals is very effective, this strategy is hampered by factors such as high complexity of the organism, low-throughput experimentation and the high maintenance cost. Therefore, simpler animal models have emerged as an alternative due to the ability to be used in large scale assays, the low cost of maintenance and the lower complexity compared to mammals. Thus, the present study aimed to develop new strategies to evaluate the effects of antipsychotics using two alternative animal models: the teleost fish zebrafish (*Danio rerio*) and the nematode worm *Caenorhabditis elegans*. In regard to zebrafish as a model, tests were developed to assess both the metabolic effect of atypical antipsychotics and the behavioral effects of these drugs. To study the adverse metabolic effect, a method was developed to evaluate the effect of these drugs on the uptake of yolk by larval zebrafish using lipophilic fluorescent probe (nile red). Moreover, three tests were developed to assess the behavioral effects using zebrafish larvae: aggregation/dispersion of melanophores, flotation behavior and spontaneous locomotor activity. While the evaluation of yolk absorption failed to predict the metabolic effects of atypical antipsychotics, behavioral tests were sensitive to the effect of antipsychotics. Clozapine and haloperidol were able to disperse melanosomes of melanophores. Furthermore, the flotation behavior was intensely induced by clozapine and risperidone, what appears to be partially mediated through H<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptor antagonism. Regarding the effect on spontaneous locomotor activity, the antipsychotic clozapine proved to be the most effective in reducing the displacement followed by risperidone and mepyramine. Regarding *C. elegans*, we tried to develop a model of social behavior to assess the effect of the antipsychotic clozapine. Therefore, it was chosen strains that exhibit social behavior, as indicated by a phenotype of aggregation. Clozapine was able to inhibit the social behavior of *C. elegans* in a concentration-dependent manner, indicating the possibility to use this model in antipsychotic evaluation. Therefore, the developed methods

contribute to study the behavioral effects of antipsychotics, suggesting the use of alternative models as a strategy to study pharmacology.

**Keywords:** zebrafish, *Danio rerio*, *Caenorhabditis elegans*, antipsychotic drugs, behavior energetic metabolism.

## Lista de figuras

**Figura 1.** Circuitos neurais envolvidos na esquizofrenia.

**Figura 2.** Valores de afinidade ( $K_i$ ) para antipsicóticos atípicos e típicos em relação a diversas classes de receptores.

**Figura 3.** Mudança de peso após 10 semanas de tratamento com vários antipsicóticos.

**Figura 4.** Peixe zebrafish adulto.

**Figura 5.** Larva de zebrafish.

**Figura 6.** Ciclo de vida do peixe zebrafish.

**Figura 7.** Cérebro de um zebrafish adulto mostrando as principais subdivisões cerebrais.

**Figura 8.** Agrupamento de neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos no sistema nervoso central de larva de zebrafish com 4 dpf.

**Figura 9.** Anatomia de um hermafrodita adulto de *C. elegans*.

**Figura 10.** Foto ilustrativa do sistema Zebrafish Stand-Alone ZF0601 - Aquatic Habitats, Estados Unidos, destacando seus componentes.

**Figura 11.** Sistema de pré-filtros e tratamento da água em barriletes.

**Figura 12.** Incubadora (estufa mini-incubadora microprocessada para B.O.D – QUIMIS - Modelo Q315M13).

**Figura 13.** Processamento de imagem de larvas marcadas com sonda lipofílica fluorescente Nile Red.

**Figura 14.** Processamento de imagem de melanóforos.

**Figura 15.** Estrutura de acrílico utilizada no experimento de flotação.

**Figura 16.** Caixa de comportamento de flotação

**Figura 17.** Desenho experimental de avaliação do comportamento de flotação.

**Figura 18.** Teste de atividade locomotora.

**Figura 19.** Efeito de dopamina e haloperidol na mobilização de vitelo em larvas de zebrafish.

**Figura 20.** Efeito de antipsicóticos atípicos na mobilização de vitelo em larvas de zebrafish.

**Figura 21.** Efeito de antipsicóticos na dispersão de melanossomos de larvas.

**Figura 22.** Curva de concentração de antipsicóticos na dispersão de melanossomos de larvas.

**Figura 23.** Diagrama demonstrando circuito neuronal que controla o comportamento de agregação e dispersão de melanóforos.

**Figura 24.** Curva de concentração de antipsicóticos atípicos no comportamento de flotação de larvas.

**Figura 25.** Curva de concentração de haloperidol e bupropiona no comportamento de flotação de larvas.

**Figura 26.** Curva de concentração de mepiramina e ketanserina no comportamento de flotação de larvas.

**Figura 27.** Efeito combinado de haloperidol e mepiramina no comportamento de flotação de larvas.

**Figura 28.** Peixes-mosquito adultos (*Gambusia affinis*) tiveram o comportamento de flotação ('surfacing') induzido após tratamento de duas horas com clorpromazina (concentrações de 0-0.5 µg/mL).

**Figura 29.** Avaliação do efeito de vários fármacos sobre a atividade locomotora de larvas.

**Figura 30.** Clozapina inibe comportamento de agregação em cepas sociais de *C. elegans*.

## **Lista de tabelas**

**Tabela 1.** As 20 causas globais de anos vivendo com incapacidade.

**Tabela 2.** Protótipos de fármacos psiquiátricos.

**Tabela 3.** Estratégia na descoberta de novos fármacos.

**Tabela 4.** Riscos de efeitos adversos metabólicos para antipsicóticos típicos e atípicos.

**Tabela 5.** Modelos comportamentais em roedores para antipsicóticos típicos e atípicos.

**Tabela 6.** Organização regional de cérebro de vertebrados.

**Tabela 7.** Receptores de monoaminas tanto em mamíferos e no zebrafish.

**Tabela 8.** Comportamentos larvais simples e complexos.

**Tabela 9:** Condições ambientais e físico-químicas do sistema de aquários.

**Tabela 10.** Fármacos utilizados nos experimentos com larvas de zebrafish.



## Lista de abreviaturas

<b>ACH</b>	Acetilcolina
<b>AMP</b>	Monofosfato de adenosina
<b>AMPc</b>	Monofosfato cíclico de adenosina
<b>AMPK</b>	Proteína cinase ativada por AMP
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>CAFE</b>	Comparison of atypicals for first episode
<b>CATIE</b>	Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness
<b>CLO</b>	Clozapina
<b>DA</b>	Dopamina
<b>EC</b>	Condutividade elétrica
<b>DARPP-32</b>	Fosfoproteína-32 regulada por dopamina e AMPc
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>Dpf</b>	dias pós-fertilização
<b>EPS</b>	Sintomas extrapiramidais
<b>GABA</b>	Ácido gama-aminobutírico
<b>GLU</b>	Glutamato
<b>HAL</b>	Haloperidol
<b>LSD</b>	Ácido lisérgico dietilamida
<b>MCH</b>	Hormônio concentrador de melanócito
<b>MEP</b>	Mepiramina
<b>MK-801</b>	Dizocilpina
<b>MSH</b>	Hormônio estimulador de melanócito
<b>NE</b>	Norepinefrina
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>NPY</b>	Neuropeptídeo Y
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PKA</b>	Proteína cinase A
<b>PPI</b>	Inibição por pré-pulso
<b>RIS</b>	Risperidona

<b>RNAm</b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>th</b>	RNAm da tirosina hidroxilase
<b>VIP</b>	Peptídeo intestinal vasoativo

## Sumário

1	Introdução.....	17
1.1	Esquizofrenia.....	21
1.2	Antipsicóticos.....	25
1.2.1	Perspectiva histórica.....	25
1.2.2	Mecanismo de ação dos antipsicóticos.....	28
1.2.3	Ganho de peso e efeitos metabólicos adversos causados por antipsicóticos atípicos.....	32
1.2.4	Modelos comportamentais no estudo de antipsicóticos.....	38
1.3	Danio rerio.....	43
1.3.1	Biologia do zebrafish.....	45
1.3.2	Sistema nervoso do zebrafish.....	48
1.3.3	Comportamento no zebrafish.....	54
1.3.3.1	Comportamento de flotação.....	57
1.3.3.2	Comportamento de camuflagem.....	60
1.3.4	Metabolismo energético em larvas de zebrafish.....	62
1.3.5	Estudos farmacológicos em larvas de zebrafish.....	64
1.4	Caenorhabditis elegans.....	67
2	Objetivos.....	70
2.1	Objetivo geral.....	70
2.2	Objetivos específicos.....	70
2.2.1	Modelo utilizando larvas de zebrafish.....	70
2.2.2	Modelo utilizando vermes nematódeos adultos de <i>C. elegans</i> .....	70
3	Materiais e métodos.....	71
3.1	Cuidados gerais: zebrafish.....	71
3.1.1	Sistema de aquários.....	71
3.1.2	Origem das matrizes de <i>Danio rerio</i> .....	75
3.1.3	Reprodução.....	75
3.1.4	Crescimento dos embriões.....	76

3.1.5	Alimentação.....	77
3.1.6	Eutanásia.....	78
3.1.7	Doenças.....	78
3.2	Fármacos: zebrafish.....	79
3.3	Tratamento farmacológico e marcação in vivo de lipídeos em larvas de zebrafish.....	79
3.4	Teste de dispersão e contração de melanóforos de larvas de zebrafish.....	81
3.5	Teste comportamental de flotação de larvas de zebrafish.....	83
3.6	Teste de atividade locomotora espontânea de larvas de zebrafish.....	86
3.7	Cuidados gerais: nematódeo <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	88
3.8	Cepas: <i>C. elegans</i> .....	89
3.9	Fármacos: <i>C. elegans</i> .....	89
3.10	Preparação de placas ágar NGM para experimento de agregação e de atividade locomotora.....	90
3.11	Preparação de placas de ágar NGM com fármacos.....	90
3.12	Comportamento de agregação.....	91
3.13	Instituições envolvidas.....	91
3.14	Análise estatística.....	91
4	Resultados e discussão.....	93
4.1	Efeito de antipsicóticos e dopamina na absorção de vitelo endógeno por larvas de zebrafish.....	93
4.2	Efeito de antipsicóticos na agregação e dispersão de melanossomas de melanóforos em larvas de zebrafish.....	99
4.3	Efeito de antipsicóticos atípicos no comportamento de flotação e na atividade locomotora espontânea de larvas de zebrafish....	106
4.4	Clozapina inibe comportamento de agregação de cepas sociais de <i>C. elegans</i> .....	126
5	Conclusão.....	132
6	Referências.....	135

## 1 Introdução

Os transtornos mentais representam uma grande parcela das doenças mundiais, causando sofrimento considerável e alto impacto econômico. No ano de 2010, das 20 causas globais de anos vivendo com incapacidade, sete eram transtornos psiquiátricos (VOS et al., 2012) (Tabela 1). A prevalência de transtornos mentais em um período de 12 meses varia de doenças menos comuns, tais como esquizofrenia (0.5) e transtorno bipolar (0.6) até doenças de prevalência alta como depressão maior (5.3) e transtornos de personalidade (9.1) (EATON et al., 2008).

**Tabela 1.** As 20 causas globais de anos vivendo com incapacidade (VOS et al., 2012). Os transtornos psiquiátricos estão destacados.

Posição	Causas
1	Dor na região lombar (lombalgia)
2	<b>Transtorno de depressão maior</b>
3	Anemia por deficiência de ferro
4	Dor na região do pescoço
5	Doença pulmonar obstrutiva crônica
6	Doenças musculoesqueléticas
7	<b>Transtornos de ansiedade</b>
8	Enxaqueca
9	Diabetes
10	Trauma causado por quedas
11	Osteoartrite
12	<b>Transtornos por uso de substância psicoativa</b>
13	Outras causas de perda auditiva
14	Asma
15	<b>Transtornos por uso de álcool</b>
16	<b>Esquizofrenia</b>
17	Trauma por acidente de trânsito
18	<b>Transtorno bipolar</b>
19	<b>Distímia</b>
20	Epilepsia

Entretanto, somente a prevalência dos transtornos mentais não indica o impacto causado pela doença. Por exemplo, esquizofrenia e transtorno bipolar apresentam as maiores taxas de incapacidade (0.53 e 0.40, respectivamente),

de acordo com estudos do “Global Burden of Diseases” da organização mundial de saúde (LOPEZ; MURRAY, 1998), indicando o quanto essas doenças são impactantes para o indivíduo.

O custo estimado referente ao gasto anual com transtornos psiquiátricos nos Estados Unidos é de 875 bilhões de dólares americanos, excluindo os transtornos de personalidade (EATON et al., 2008). Esses custos dependem de variáveis complexas tais como a prevalência da doença, a incapacidade associada ao transtorno e os custos da terapia, tanto farmacológica como psicológica. Apesar da necessidade de novos fármacos psiquiátricos e do aperfeiçoamento dos já existentes, a aprovação de medicamentos com novos mecanismos de ação têm sido cada vez mais rara. Enquanto a aprovação de fármacos psiquiátricos demora em torno de 12.6 anos, a de fármacos indicado para doenças cardiovasculares demora em média 7.5 anos (KOLA; LANDIS, 2004). Além disso, fármacos neuropsiquiátricos possuem uma menor chance de alcançar o mercado (7%) quando comparados com fármacos indicados às outras áreas terapêuticas (15%) (PANGALOS; SCHECHTER; HURKO, 2007)

Várias razões levam ao baixo sucesso no desenvolvimento de fármacos psiquiátricos. Estes medicamentos são distintos por agirem principalmente no sistema nervoso central (SNC), um tecido altamente complexo que promove a homeostase do organismo e o controle do comportamento. O efeito farmacológico não depende apenas como o fármaco irá alterar a atividade de um neurônio, mas sim como irá afetar o funcionamento do sistema como um complexo circuito de neurônios interligados. Assim, o resultado final da ação farmacológica dependerá da integração de vários sinais que, por final, irá gerar o comportamento (NESTLER; HYMAN; MALENKA, 2008)

Além da complexidade do sistema nervoso central, os fármacos neuropsiquiátricos possuem maior tendência em causar efeitos adversos relacionados, tais como náusea, convulsão e tontura. Outra dificuldade é a

presença da barreira hematoencefálica pela qual os medicamentos devem ultrapassar para que o efeito terapêutico ocorra. E, por último, a falta de biomarcadores validados que indiquem o sucesso terapêutico do fármaco prejudica a aprovação de medicamentos em fases mais avançadas de teste clínico (PANGALOS; SCHECHTER; HURKO, 2007). Esses fatores somados explicam, em parte, a maior dificuldade em produzir medicamentos psiquiátricos inovadores.

Há duas estratégias básicas para o desenvolvimento de fármacos. Na estratégia baseada em alvos, procura-se entender as vias moleculares que participam da doença, identificando possíveis alvos que, se modulados por meio de medicamentos, possam levar a um efeito terapêutico. Por outro lado, na estratégia baseada em fenótipos, estudam-se os mecanismos de ação de fármacos já existentes no tratamento de transtornos neuropsiquiátricos. Ao definir os efeitos desses fármacos no comportamento e na fisiologia de animais experimentais, pode-se usar esses fenótipos como modelo na seleção de novos fármacos com potencial terapêutico (PANGALOS; SCHECHTER; HURKO, 2007).

Entretanto, a estratégia baseada em alvos é limitada, principalmente no caso das doenças psiquiátricas. Primeiramente, porque os transtornos psiquiátricos ainda não têm bases moleculares bem definidas. Segundo, os modelos *in vitro* não refletem a complexidade do SNC. E, terceiro, não há modelos animais que refletem fidedignamente a totalidade dos sintomas de cada doença mental (SAMS-DODD, 2005). Já o estudo de como os fármacos alteram o fenótipo (comportamento e fisiologia) de humanos e animais tem sido essencial na descoberta de medicamentos. A vantagem em comparação com a estratégia baseada em alvos é que não precisa de ideias pré-concebidas sobre o mecanismo de ação, o que aumenta a probabilidade de encontrar moléculas que atuam em alvos apropriados ao efeito terapêutico. Muitos dos fármacos utilizados atualmente foram baseados em protótipos descobertos décadas atrás

através do uso dessa estratégia (Tabela 2) (KOKEL; PETERSON, 2008). Uma das críticas dessa estratégia é que, ao utilizar como guia o mesmo fenótipo causado pelo medicamento protótipo, descobrem-se fármacos com mecanismos de ação similares, mas não tão inovadores. Além disso, essa estratégia é difícil de ser estudada em grande escala em modelos de roedores, dificultando a análise de centenas de compostos (SWINNEY; ANTHONY, 2011).

**Tabela 2.** Protótipos de fármacos psiquiátricos. Adaptado (KOKEL; PETERSON, 2008).

<b>Classe terapêutica</b>	<b>Protótipo</b>	<b>Data da descoberta</b>
Antipsicóticos típicos	Clorpromazina	1952
	Haloperidol	1958
Antipsicótico atípico	Clozapina	1966
Estimulante	Anfetamina	1937
Estabilizador de humor	Lítio	1949
	Lamotrigina	1990
	Valproato	1962
Antidepressivo	Iproniazida	1957
	Imipramina	1956
	Fluoxetina	1988
Ansiolítico	Clordiazepóxido	1958

Para atender a demanda por novos fármacos psiquiátricos torna-se essencial o desenvolvimento de abordagens mais eficazes. Entretanto, seria interessante que as abordagens fossem efetivas mesmo sem um entendimento completo acerca dos mecanismos envolvidos nos transtornos psiquiátricos (BERTON; NESTLER, 2006). Portanto, como seria possível melhorar a eficiência no desenvolvimento de fármacos neuroativos?

Embora a descoberta de fármacos psiquiátricos em mamíferos (roedores e humanos) seja muito eficaz, essa estratégia é dificultada por fatores como a alta complexidade do organismo, o baixo escalonamento e o alto custo (Tabela 3). A partir desse problema, modelos animais mais simples foram desenvolvidos para facilitar a descoberta de fármacos baseadas no fenótipo. O uso de animais como



o nematódeo *Caenorhabditis elegans* e o peixe teleósteo zebrafish (*Danio rerio*, chamado de paulistinha no Brasil) permitem combinar a estratégia de descoberta baseada em fenótipo com melhor produtividade, realizando experimentos em uma escala maior se comparada aos experimentos que utilizam mamíferos como modelos (BURNE et al., 2011).

**Tabela 3.** Estratégia na descoberta de novos fármacos. Adaptado (KOKEL; PETERSON, 2008).

Sistema utilizado	Vantagens	Desvantagens
<b>Mamífero</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Relevância <i>in vivo</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baixa escala</li> <li>• Alto custo</li> </ul>
<b><i>In vitro</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grande escala</li> <li>• Alvo conhecido</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Não pode ser usado para identificar novos alvos</li> <li>• Relevância <i>in vivo</i> não determinada</li> </ul>
<b>Zebrafish e <i>C. elegans</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Grande escala</li> <li>• Relevância <i>in vivo</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modelos imperfeitos da biologia humana</li> </ul>

O presente estudo propôs desenvolver novos métodos para serem utilizados na estratégia baseada em fenótipos utilizando como modelos animais o peixe teleósteo zebrafish e o verme nematódeo *C. elegans*. A classe de medicamentos antipsicóticos foi escolhida como modelo farmacológico. Assim, as subseções que seguem são um aprofundamento sobre os temas para um melhor entendimento acerca deste estudo.

## 1.1 Esquizofrenia

Antes de iniciar uma revisão farmacológica sobre a classe de medicamentos denominada antipsicóticos, faz-se necessário uma discussão sobre o uso desses medicamentos na clínica. Os antipsicóticos são primariamente utilizados para tratar sintomas psicóticos (sintomas positivos), sendo esses sintomas

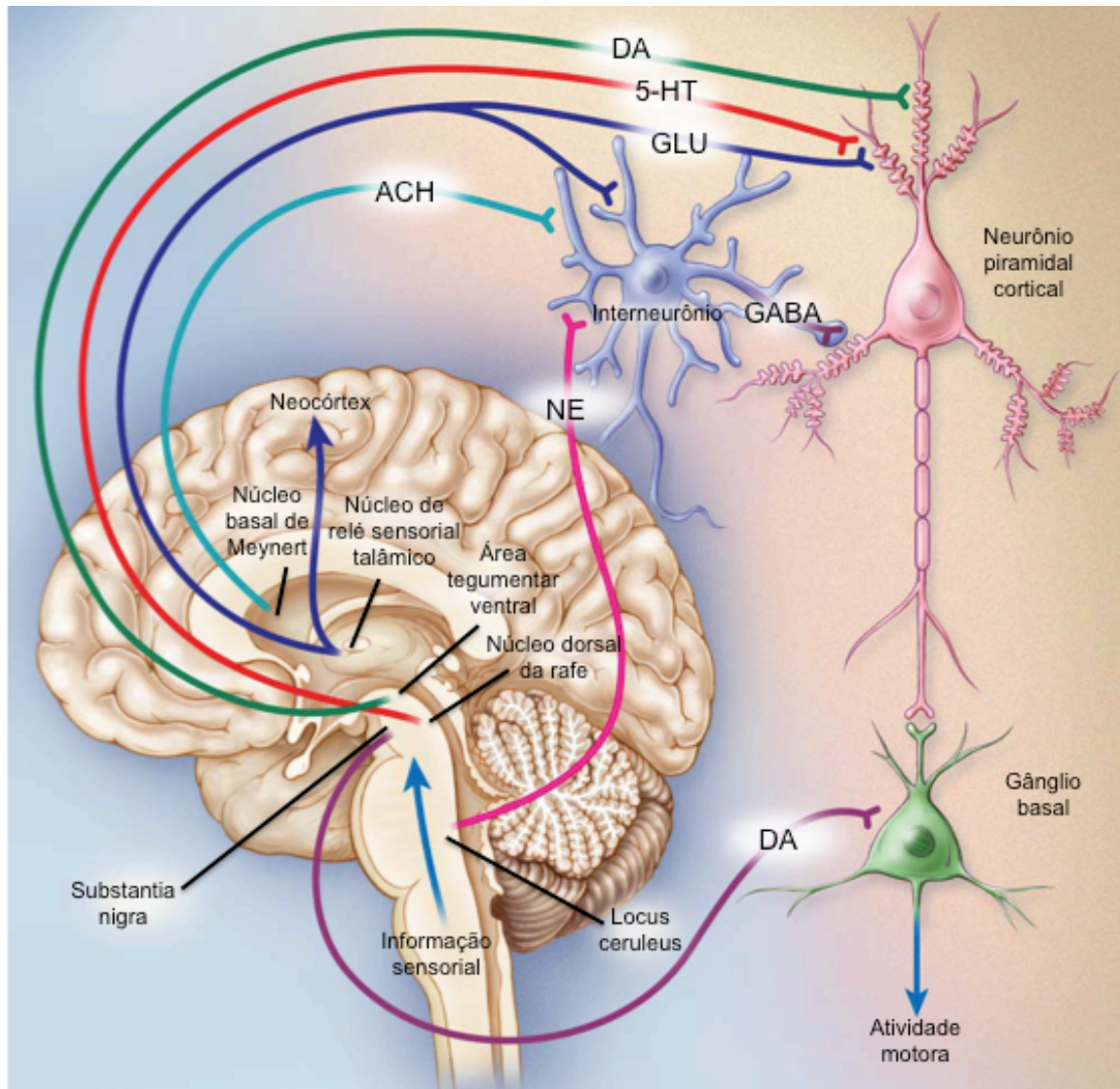
característicos da esquizofrenia, mas não exclusivos desse transtorno. Os sintomas positivos são caracterizados por delírios e alucinações auditivas proeminentes, na qual o indivíduo afetado não percebe a natureza patológica da alucinação. Outros sintomas positivos ocorrem, tal como processos desorganizados do discurso e comportamento catatônico ou desorganizado (FREEDMAN, 2003). Além dos sintomas psicóticos, pacientes esquizofrênicos apresentam sintomas agrupados em mais três categorias: (I) sintomas negativos (embotamento afetivo, falta de motivação, redução da fala espontânea e apatia); (II) sintomas cognitivos (dificuldades na memória, atenção e função executiva); (III) desregulação afetiva que pode levar a sintomas depressivos ou maníacos (VAN OS; KAPUR, 2009).

Os pacientes esquizofrênicos apresentam dificuldade em processar tanto estímulos externos quanto internos, não conseguindo filtrar informações relevantes, o que os tornam hipervigilantes (KAPUR, 2003). A esquizofrenia geralmente inicia-se no final da adolescência perdurando por toda vida (DSM-IV). Entretanto, os pacientes possuem uma história anterior de disfunção comportamental, apresentando principalmente dificuldades no aprendizado e na relação social (ERLENMEYER-KIMLING et al., 2000).

Não há lesões no cérebro de portadores de esquizofrenia que parecem ser responsáveis pela doença. Entretanto, já foi demonstrado, através de exames de imagem, que pacientes esquizofrênicos apresentam ventrículos aumentados e volume cerebral reduzido, com destaque para o hipocampo e córtex temporal superior (KUBICKI, 2002). A redução de volume cerebral não se explica inteiramente por um menor número de neurônios, mas principalmente por uma redução da neurópila cortical (redução dos prolongamentos dos axônios e dendritos no córtex), o que a leva a uma menor conexão entre os neurônios piramidais e interneurônios inibitórios, principalmente no córtex pré-frontal (SELEMON; RAJKOWSKA; GOLDMAN-RAKIC, 1998). Além da menor conectividade, o número e a atividade dos interneurônios inibitórios parece estar

reduzido na esquizofrenia (WOO et al., 1998). Isso é particularmente importante porque os interneurônios reduzem a atividade dos neurônios piramidais através do uso do neurotransmissor GABA (BENES; BERRETTA, 2001) e é exatamente a alta atividade dos neurônios piramidais que está relacionada com os sintomas psicóticos (FREEDMAN, 2003) (Figura 1).

Tanto as atividades dos neurônios piramidais quanto dos interneurônios são moduladas por neurônios dopaminérgicos, através de conexões diretas e indiretas com o córtex, principalmente o pré-frontal (LAVIOLETTE, 2007). Isso implica que a dopamina possui um papel importante no controle da atividade cortical e vários estudos têm demonstrado que a modulação do sistema dopaminérgico é capaz de induzir ou inibir sintomas psicóticos. Sabe-se que todos os fármacos antipsicóticos utilizam do bloqueio da dopamina como mecanismo terapêutico (KAPUR; REMINGTON, 2001). Além disso, foi demonstrado, através de estudos de imagem, que há uma maior liberação de dopamina no estriado de pacientes esquizofrênicos após tratamento agudo com amfetamina (BREIER et al., 1997). E, por último, é possível induzir sintomas psicóticos tanto em animais como em humanos através do uso de fármacos que potencializam a sinalização dopaminérgica (CURRAN; BYRAPPA; MCBRIDE, 2004; ROBINSON; BECKER, 1986).



**Figura 1.** Circuitos neurais envolvidos na esquizofrenia. Núcleos talâmicos direcionam informação sensorial a redes de neurônios piramidais no córtex límbico e neocórtex através de aferentes excitatórios glutamatérgicos. Vários núcleos subcorticais facilitam a resposta dos neurônios piramidais. Dopamina (DA), liberada a partir da área tegumentar ventral, ativa receptores  $D_1$  e  $D_2$  que aumentam respostas neurais ao glutamato (GLU). Serotonina (5-HT) do núcleo dorsal da rafe ativa receptores  $5-HT_{2a}$  que facilitam a liberação de glutamato de terminais pré-sinápticos. Os interneurônios do córtex cerebral reduzem a atividade dos neurônios piramidais através de conexão pré-sináptica inibitória por meio da liberação do neurotransmissor GABA. Os interneurônios são ativados por glutamato através do receptor NMDA. Fármacos que antagonizam esses receptores reduzem a liberação de GABA pelos interneurônios levando a uma hiperativação dos neurônios piramidais. Além disso, acetilcolina (ACH) ativa os interneurônios através de receptores nicotínicos. Adaptado (FREEDMAN, 2003).

Entretanto, fármacos que atuam em outros sistemas, tais como glutamatérgico e serotoninérgico, também podem induzir sintomas positivos. Por exemplo, o ácido lisérgico dietilamida (LSD), através da ativação de receptores de serotonina 5-HT<sub>2a</sub> no córtex, causa alucinações e outros sintomas psicóticos (GEYER; VOLLENWEIDER, 2008). Já antagonistas do receptor glutamatérgico do tipo NMDA, tal como a fenciclidina e cetamina, são capazes de induzir sintomas psicóticos intensos (FARBER, 2003). Assim, além da dopamina, outros neurotransmissores também são capazes de induzir sintomas positivos, o que indica que a esquizofrenia não é apenas uma consequência de um desequilíbrio dopaminérgico. Dessa forma, o papel importante de várias vias neurotransmissoras na patogênese da esquizofrenia permite utilizar diversos receptores como possíveis alvos farmacológicos (ROTH; SHEFFLER; KROEZE, 2004).

## **1.2 Antipsicóticos**

### **1.2.1 Perspectiva histórica**

Os primeiros antipsicóticos foram desenvolvidos enquanto pesquisadores estavam à procura de melhores antihistamínicos. Em 1950, o anesthesiologista Francês Henri Laborit descobriu que o antihistamínico prometazina (Fenergan), uma fenotiazina, aumentava a atividade de certos agentes anestésicos. Assim, outros pesquisadores iniciaram uma busca de derivados de fenotiazina que apresentassem efeitos similares (SHEN, 1999). Então, em 1951, Paul Charpentier desenvolveu a clorpromazina, e liberou o fármaco para estudos clínicos no início do ano de 1952 sob o nome de 'Largactil' (BAN, 2007). No ano de 1952, Laborit utilizou a clorpromazina como adjunto de anestésicos cirúrgicos (coquetel lítico), principalmente devido à sua capacidade de reduzir a temperatura corporal. Além dos efeitos esperados do tratamento, os pesquisadores relataram que o tratamento com clorpromazina induzia um estado de desinteresse, mas sem causar perda de consciência (SHEN, 1999).

Como o emprego de água gelada já tinha sido usada na França como forma de controlar a agitação de pacientes psiquiátricos, Laborit conseguiu convencer psiquiatras de Paris a testar a clorpromazina em seus pacientes, já que este fármaco era capaz de reduzir a temperatura corporal. Após tratamento do primeiro paciente psiquiátrico com clorpromazina, o efeito calmante foi imediato. Logo, outros estudos relataram efeitos similares e não demoraram a perceber que o efeito calmante não era causado pela redução da temperatura, mas sim por efeito farmacológico desconhecido. Assim, em um período curto entre 1953 e 1955, a clorpromazina foi difundida no tratamento psiquiátrico. A introdução desse medicamento levou a uma mudança radical na clínica e muitos pacientes hospitalizados puderam finalmente ser liberados das instituições psiquiátricas (BAN, 2007).

Na busca de outros medicamentos com efeitos terapêuticos similares, foram utilizados, como guia, os efeitos comportamentais causados pela clorpromazina em modelos animais. Os efeitos comportamentais induzidos eram variados, mostrando-se capaz de inibir a êmese induzida por apomorfina (agonista dopaminérgico), induzir a imobilidade cataleptica, reduzir a atividade locomotora, como também reduzir a resposta de esquiva inibitória condicionada em camundongos (BAN, 2007). O pesquisador Janssen, ao procurar outros compostos capazes de induzir catalepsia, acabou por descobrir o haloperidol (JANSSEN et al., 1959). Este fármaco mostrou-se 50-100 vezes mais potente e com menos efeitos colaterais que a clorpromazina, sendo amplamente utilizado na clínica até os dias de hoje como um dos principais antipsicóticos no tratamento de esquizofrenia.

Logo após a introdução da clorpromazina na clínica ficou evidente os efeitos extrapiramidais (EPS) agudos (dias a meses) induzidos por esses neurolepticos, tais como acatisia, parkinsonismo e distonia (AYD, 1961). Além disso, relacionou-se o uso crônico (de meses a anos) desses antipsicóticos à

discinesia tardia, um transtorno caracterizado por movimentos repetitivos involuntários (CRANE, 1968). Os EPS causados pelos neurolépticos eram tão característicos que os pesquisadores estavam convencidos de uma correlação entre a magnitude do EPS e a eficácia clínica.

Essa convicção levou a comunidade científica a menosprezar outros compostos que apresentavam atividade antipsicótica mas não causavam EPS, tal como a clozapina, descoberta ainda na década de 60 (HIPPIUS, 1989). Embora o efeito atípico da clozapina fizesse com que vários pesquisadores não a considerasse um neuroléptico, outros pesquisadores insistiram que os efeitos terapêuticos, não apenas os efeitos adversos, fossem o objetivo no desenvolvimento de novos antipsicóticos. Dessa forma, vários estudos demonstraram que a clozapina era eficaz no tratamento de esquizofrenia, sem causar os EPS (ANGST et al., 2009).

Embora a eficácia clínica da clozapina tivesse sido relatada, pesquisadores finlandeses relataram casos fatais de agranulocitose em 8 pacientes tratados com esse fármaco, com uma incidência de pelo menos 0.5% (IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ et al., 1977). Após o estudo, a farmacêutica Sandoz, proprietária da patente da clozapina, retirou o antipsicótico do mercado. Entretanto, anos mais tarde, um estudo duplo-cego demonstrou a eficácia da clozapina no tratamento de pacientes esquizofrênicos resistentes à outros antipsicóticos (KANE et al., 1988). Após essa publicação, a clozapina passou a ser indicada como fármaco de escolha para pacientes resistentes a tratamento, mas com monitoramento intensivo dos perfil hematológico.

O sucesso da clozapina levou ao desenvolvimento de antipsicóticos com perfis clínicos semelhantes (e.g., risperidona, olanzapina e quetiapina), todos com menor propensão em provocar EPS. Os antipsicóticos com perfil semelhante ao da clozapina foram classificados de atípicos ou de segunda geração, principalmente por terem menor capacidade em causar EPS. Por outro lado, os antipsicóticos chamados de neurolépticos, por serem os protótipos dos

antipsicóticos e por causa dos EPS, foram denominados de típicos ou de primeira geração (GRÜNDER; HIPPIUS; CARLSSON, 2009).

### **1.2.2 Mecanismos de ação dos antipsicóticos**

As principais teorias acerca do mecanismo de ação de antipsicóticos surgiram ainda na década de 60. Carlsson e Lindqvist (CARLSSON; LINDQVIST, 1963), ao estudarem os efeitos do haloperidol e clorpromazina em cérebros de camundongo, relataram um aumento de metabólitos de dopamina em resposta ao tratamento com esses antipsicóticos. Os pesquisadores sugeriram que esse aumento pudesse ser devido ao bloqueio de receptores monoaminérgicos localizados no sistema nervoso central. Apesar disso, somente 12 anos mais tarde os receptores dopaminérgicos foram identificados como os alvos moleculares dos neurolépticos (CREESE; BURT; SNYDER, 1976; SEEMAN; LEE, 1975), iniciando a hipótese de disfunção dopaminérgica na esquizofrenia.

O sistema nervoso de mamíferos apresenta cinco tipos de receptores de dopamina que são divididos em duas classes: receptores do tipo D<sub>1</sub> (D<sub>1</sub>, D<sub>5</sub>) e receptores do tipo D<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>) (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011). Enquanto a classe D<sub>1</sub> se acopla à proteína G que ativa a enzima adenilato ciclase, a classe D<sub>2</sub> se acopla à outra proteína G que inibe a mesma enzima. Uma vez que as classes D<sub>1</sub> e D<sub>2</sub> agem de forma antagônica na modulação da adenilato ciclase, os níveis intracelulares de AMP cíclico (AMPc) são regulados de forma precisa. Um aumento dos níveis de AMPc ativa a proteína quinase A (PKA) que é responsável por regular várias outras moléculas, principalmente a fosfoproteína-32 regulada por dopamina e AMPc (DARPP-32). A DARPP-32 parece integrar sinais convergentes de múltiplos receptores atuando na regulação de vários componentes de neurotransmissão (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011). Essa via parece ser responsável em mediar vários dos efeitos comportamentais induzidos por agonistas dopaminérgicos, como indicado pelo déficit comportamental demonstrado por camundongos nocautes



para DARPP-32 (FIENBERG, 1998; ZHANG et al., 2006). Entretanto, camundongos nocaute para DARPP-32 ainda conseguem responder de forma parcial à agonistas de dopamina, sugerindo a existência de outros mecanismos de sinalização (NALLY et al., 2004; WADDINGTON et al., 2005). Além dessa via, parte dos efeitos comportamentais parecem ser mediados pela modulação da via de AKT/GSK3 (BEAULIEU; GAINETDINOV; CARON, 2009). Nessa via, o agonismo de  $D_2$  parece reduzir a atividade de AKT através da desfosforilação da treonina 308, o que parece depender da formação de um complexo entre AKT, proteína fosfatase 2A, beta-arrestina e receptor  $D_2$  (BEAULIEU et al., 2005).

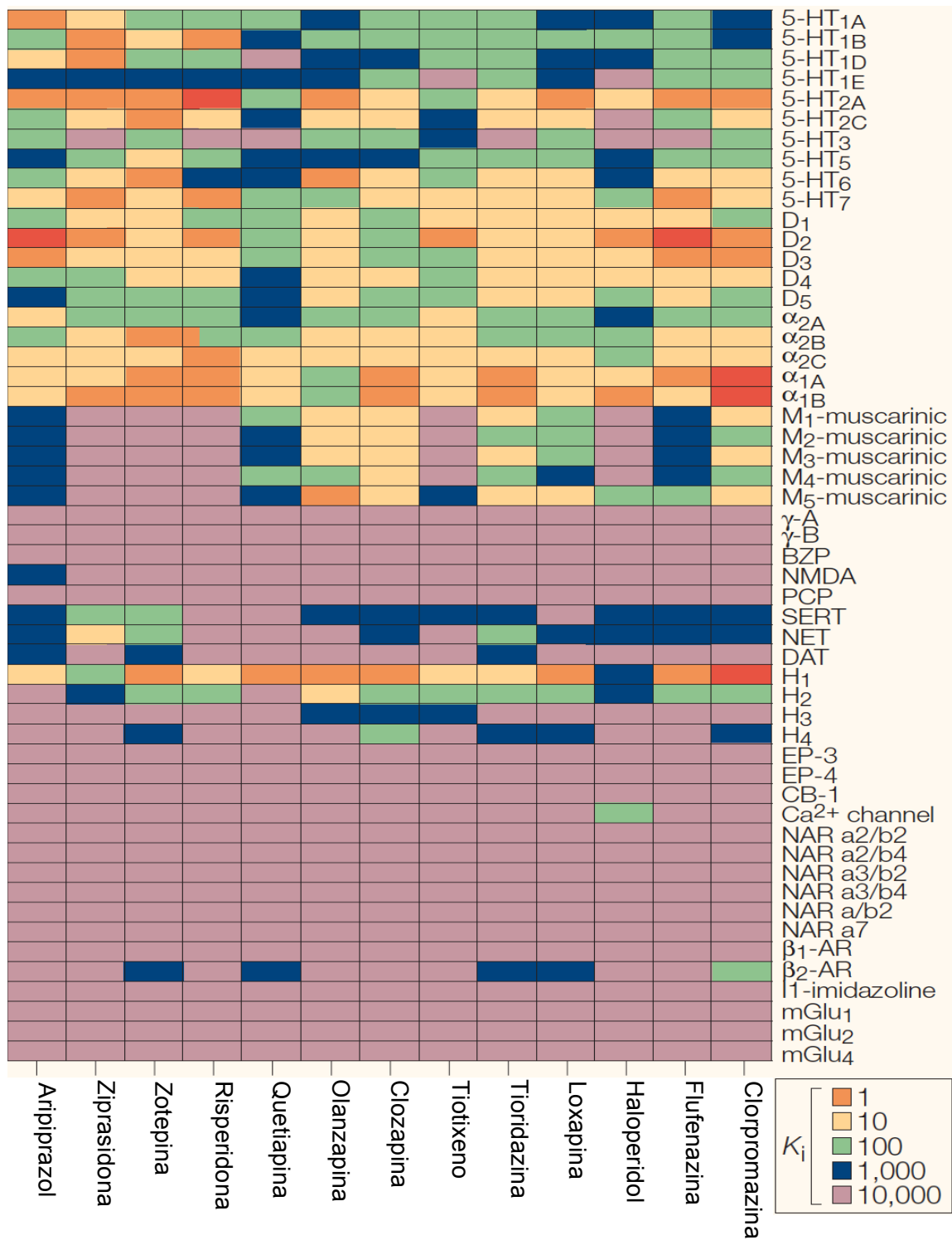
Diversos estudos demonstraram que tanto os antipsicóticos típicos quanto atípicos utilizam necessariamente do antagonismo do receptor de dopamina  $D_2$  como mecanismo de ação terapêutico (KAPUR; REMINGTON, 2001; WADENBERG et al., 2001). Se os antipsicóticos dividem o bloqueio do receptor de dopamina  $D_2$ , como os típicos e os atípicos diferem na indução de EPS? Várias teorias farmacológicas foram formuladas para explicar o comportamento singular dos antipsicóticos atípicos.

Uma das primeiras hipóteses surgiu após análise da afinidade de antipsicóticos típicos e atípicos por diversos receptores. A partir desse estudo, foi proposto que os antipsicóticos atípicos são definidos por apresentarem uma maior afinidade relativa ao receptor de serotonina  $5-HT_{2a}$  em relação ao receptor de dopamina  $D_2$  (hipótese  $S_2/D_2$  sobre comportamento atípico) (MELTZER; MATSUBARA; LEE, 1989). A partir dessa hipótese, vários antipsicóticos foram desenvolvidos utilizando a relação  $S_2/D_2$ , incluindo olanzapina, quetiapina e ziprasidona (ROTH; SHEFFLER; KROEZE, 2004). Antagonistas de  $5-HT_{2a}$ , além de aumentarem a sinalização dopaminérgica no estriado, induzem a liberação de dopamina no córtex pré-frontal e hipocampo (MELTZER, 1999). Além disso, o antagonismo de  $5-HT_{2a}$  modula tanto a neurotransmissão de neurônios aferentes do estriado como dos neurônios da área tegumentar ventral, regulando assim o sistema dopaminérgico. Esses mecanismos logicamente contribuem para a

menor propensão dos antipsicóticos atípicos em induzir EPS. No entanto, foi demonstrado que mesmo risperidona ocupando mais de 80% de receptores 5-HT<sub>2a</sub> corticais (KAPUR; ZIPURSKY; REMINGTON, 1999), este antipsicótico ainda pode causar EPS em altas doses (YAMADA et al., 2002), sugerindo a existência de outros mecanismos para o comportamento atípico.

Uma outra hipótese sobre a 'atipicalidade' é a de que antipsicóticos dissociam do receptor de dopamina D<sub>2</sub> em taxas variadas. Nesse caso, os antipsicóticos atípicos apresentam uma dissociação mais rápida que os típicos, com uns se dissociando mais rapidamente que outros (e.g., quetiapina > clozapina > olanzapina > ziprasidona > risperidona) (KAPUR; SEEMAN, 2001). A hipótese sugere que uma dissociação mais rápida permite que a transmissão dopaminérgica não seja bloqueada drasticamente, evitando os EPS.

Além dessas duas hipóteses, a atipicalidade foi vinculada à afinidade múltipla dos atípicos por outros alvos, tais como receptor de histamina (H<sub>1</sub>), receptores de serotonina (além de 5-HT<sub>2a</sub>, os receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub>), receptores muscarínicos, colinérgicos e adrenérgicos (Figura 2). A ação pleiotrópica dos atípicos ao interagir com vários receptores aparentemente, os torna clinicamente mais eficazes que antipsicóticos que possuem uma certa seletividade para receptores específicos (ROTH; SHEFFLER; KROEZE, 2004).



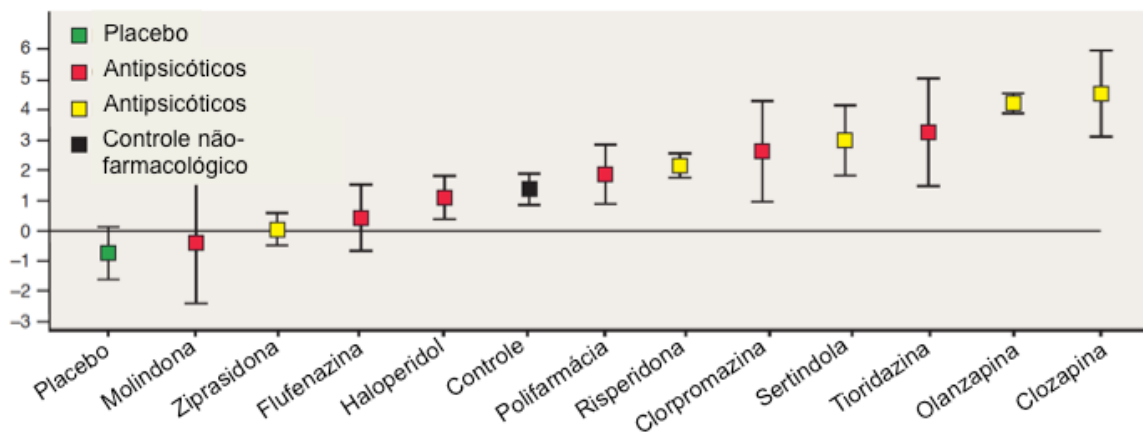
**Figura 2.** Valores de afinidade ( $K_i$ ) para antipsicóticos atípicos e típicos em relação a diversas classes de receptores. Quanto menor o valor de  $K_i$  maior a afinidade pelo receptor. Adaptado (ROTH; SHEFFLER; KROEZE, 2004).

Por exemplo, a clozapina é mais efetiva em tratar esquizofrenia resistente a tratamento do que outros antipsicóticos (KANE et al., 1988), sendo referida como o 'padrão ouro' entre os antipsicóticos atípicos (VOLAVKA, 2012). A razão dessa vantagem está ligada à múltipla afinidade da clozapina com vários receptores relacionados à patologia da esquizofrenia. A superioridade da clozapina no tratamento resistente a outros antipsicóticos tem sido confirmada em quase todas as avaliações (MONCRIEFF, 2003). Além de apresentar vantagens no tratamento de sintomas positivos, a clozapina apresenta uma maior eficácia na redução do risco de suicídio (MELTZER, 2013), sendo o único medicamento aprovado para prevenção da tentativa recorrente de suicídio nos Estados Unidos.

Apesar do sucesso terapêutico da clozapina, os outros antipsicóticos atípicos aparentemente não apresentam eficácia muito superior em relação aos antipsicóticos típicos. Os únicos antipsicóticos atípicos que se mostraram relativamente superiores (melhora geral dos sintomas, tanto positivos como negativos) em relação aos antipsicóticos típicos de alta potência (e.g., haloperidol) foram amisulprida, clozapina, olanzapina e risperidona (LEUCHT et al., 2013). Outro aspecto importante é que alguns antipsicóticos atípicos, como a olanzapina, apresentam menor taxa de descontinuação do tratamento quando comparado a antipsicóticos típicos de alta potência, o que é importante para evitar a recidiva de surtos psicóticos (LIEBERMAN et al., 2005). Assim, a vantagem geral dos antipsicóticos atípicos sobre os típicos deve-se principalmente à menor probabilidade de causar EPS (MELTZER, 2013). Entretanto, quanto à eficácia, apenas certos antipsicóticos atípicos possuem superioridade em relação aos típicos.

### **1.2.3 Ganho de peso e efeitos metabólicos adversos causados por antipsicóticos atípicos**

Apesar da relativa superioridade clínica de alguns antipsicóticos atípicos e da menor probabilidade de induzir EPS por esses medicamentos, os antipsicóticos de segunda geração não estão livres de graves efeitos colaterais. Sabe-se que alguns antipsicóticos atípicos induzem ganho de peso considerável, o que contribui para uma maior incidência de dislipidemia e diabetes tipo 2. A primeira meta-análise a avaliar o ganho de peso induzido por antipsicóticos (ALLISON et al., 1999) demonstrou que clozapina e olanzapina são os antipsicóticos que mais induzem o ganho de peso, com efeitos intermediários de quetiapina, risperidona e clorpromazina e mínimos para haloperidol e ziprasidona (Figura 3).



**Figura 3.** Mudança de peso após 10 semanas de tratamento com vários antipsicóticos. Dados representam 95% de intervalo de confiança a partir de modelo de efeito aleatório. Adaptado (ALLISON et al., 1999).

Além dessa meta-análise, um importante estudo independente da indústria farmacêutica, chamado de CATIE (do inglês, Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness), demonstrou que o tratamento com olanzapina causou o maior ganho de peso (0.9 kg/mês), seguido por quetiapina (0.2 kg/mês) e risperidona (0.2 kg/mês), enquanto flufenazina (antipsicótico típico) e ziprasidona induziram uma leve perda de peso (LIEBERMAN et al., 2005). O ganho de peso parece ser ainda maior em pacientes que tiveram a primeira exposição a antipsicóticos. No estudo chamado de CAFE (do inglês, Comparison of atypicals for first episode), adultos que foram tratados após o

primeiro episódio de esquizofrenia apresentaram quase três vezes mais ganho de peso do que no estudo CATIE (MCEVOY et al., 2006). O ganho de peso ocorre de maneira independente do sexo, puberdade e grupo étnico, apresentando grande variação entre indivíduos, até mesmo sob o uso do mesmo antipsicótico (CORRELL et al., 2009).

Outros efeitos metabólicos como dislipidemia, hiperglicemia, diabetes tipo 2, parecem ser causa indireta do ganho de peso. Entretanto, alguns antipsicóticos parecem atuar de maneira independente, induzindo efeitos metabólicos mais severos. Por exemplo, clozapina e olanzapina induzem dislipidemia de forma independente da massa corporal, causando hipertrigliceridemia e baixos níveis de HDL (BIRKENAES et al., 2008). Além disso, diversos estudos demonstraram que o tratamento agudo com olanzapina e clozapina podem induzir resistência a insulina e disfunção das células  $\beta$ -pancreáticas tanto em modelos animais (ADER et al., 2005; CHINTOH et al., 2008, 2009; HOUSEKNECHT et al., 2007) como em humanos (SACHER et al., 2008). No entanto, outros antipsicóticos atípicos como aripiprazol e ziprasidona parecem não induzir ganho de peso algum (SACHER et al., 2008). Assim, os efeitos metabólicos causados por antipsicóticos atípicos não são característicos de toda classe, com uns apresentando efeitos adversos mais intensos que outros. Além disso, antipsicóticos típicos de baixa potência, como a clorpromazina, também causam efeitos metabólicos severos, o que desmistifica o ganho de peso ser inerente aos antipsicóticos atípicos (LEUCHT et al., 2013) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Riscos de efeitos adversos metabólicos para antipsicóticos típicos e atípicos. Adaptado (CORRELL; LENCZ; MALHOTRA, 2011).

<b>Antipsicóticos</b>	<b>Afinidade por receptores</b>	<b>Ganho de peso</b>	<b>Dislipidemia</b>	<b>Hiperglicemia e resistência à insulina</b>
<b>Típicos</b>				
Clorpromazina	$H_1 \gg D_2$	Alto	Alto	Alto

Ferfenazina	D <sub>2</sub> > outros receptores	Baixo	Baixo	Baixo
Haloperidol	D <sub>2</sub> > outros receptores	Baixo	Baixo	Baixo
<b>Atípicos</b>				
Amisulprida	D <sub>2</sub> /D <sub>3</sub> com seletividade para certas regiões cerebrais	Baixo	Baixo	Baixo
Clozapina	M <sub>1</sub> > 5-HT <sub>2A</sub> > H <sub>1</sub> > 5-HT <sub>2C</sub> > alfa1 > alfa2 >>> D <sub>2</sub>	Alto	Alto	Alto
Olanzapina	H <sub>1</sub> > 5-HT <sub>2A</sub> > M <sub>1</sub> > 5-HT <sub>2C</sub> > D <sub>2</sub>	Alto	Alto	Alto
Risperidona	5-HT <sub>2A</sub> >> alfa1 > D <sub>2</sub>	Médio	Médio	Médio
Quetiapina	Alfa1 > H <sub>1</sub> > 5HT <sub>2A</sub> > alpha 2 > M <sub>1</sub> >> D <sub>2</sub> ; inibe recaptção de serotonina	Médio	Alto	Médio
Ziprasidona	5HT <sub>2A</sub> >> D <sub>2</sub> ; agonismo parcial 5-HT <sub>1A</sub> ; inibe recaptção de noradrenalina	Baixo	Baixo	Baixo
Aripiprazol	Agonismo parcial em D <sub>2</sub> > agonismo parcial 5-HT <sub>1A</sub> > agonismo 5-HT <sub>2A</sub>	Baixo	Baixo	Baixo

Esses efeitos adversos são importantes na redução da qualidade de vida e na morte prematura de pacientes, principalmente devido aos transtornos cardiovasculares associados às doenças psiquiátricas mais severas (TIIHONEN et al., 2009). Além disso, não há tratamentos eficazes contra os efeitos metabólicos adversos, e o peso do paciente parece não voltar para valores anteriores ao do início do tratamento (MAAYAN; VAKHRUSHEVA; CORRELL, 2010).

Após ser determinada a associação entre o uso de antipsicóticos e o desenvolvimento de efeitos metabólicos adversos, quais seriam as vias que levam a esses efeitos? Sabe-se que o peso de um indivíduo é determinado pelo equilíbrio entre o consumo de energia e o gasto energético (GISKES et al.,

2011). Os antipsicóticos parecem interferir em várias etapas desse equilíbrio energético, mas os estudos nem sempre são conclusivos (CORRELL; LENCZ; MALHOTRA, 2011).

Entre as mudanças comportamentais, foi sugerido que pacientes sob tratamento com antipsicóticos atípicos manifestam maior desinibição sobre o apetite e maior suscetibilidade a serem induzidos à fome por estímulos externos (BLOUIN et al., 2008). Além disso, pacientes jovens tratados com olanzapina apresentaram ganho de peso associado a aumento do consumo calórico sem mudança da composição da dieta (GOTHELF et al., 2002).

Modelos utilizando roedores corroboram a hipótese que o tratamento com antipsicóticos atípicos, principalmente olanzapina, clozapina e risperidona, são capazes de aumentar o consumo de alimentos hipercalóricos com redução da saciedade e aumento do apetite (COCCURELLO et al., 2006; COPE et al., 2009; DAVOODI et al., 2009; FELL et al., 2007; HARTFIELD; MOORE; CLIFTON, 2003; VICTORIANO et al., 2009; WALLINGFORD et al., 2008). Além do aumento do consumo calórico, o tratamento com antipsicóticos atípicos parece reduzir a atividade física de roedores, colaborando para o equilíbrio energético ser deslocado para o ganho de peso e acúmulo de gordura (ALBAUGH et al., 2011; COPE et al., 2009; HILLEBRAND et al., 2005).

Além das mudanças comportamentais, os antipsicóticos atípicos parecem atuar de maneira mais direta no metabolismo energético. Por exemplo, foi demonstrado que o tratamento crônico com olanzapina reduz a termogênese em ratos, o que parece envolver redução da atividade da gordura marrom (STEFANIDIS et al., 2009). Uma vez que o tratamento com olanzapina reduz o gasto energético da termogênese, a energia dos nutrientes pode ser deslocada para o acúmulo de gordura. Dessa forma, o tratamento com olanzapina pode induzir o ganho de peso ao reduzir o metabolismo basal.



Além disso, os antipsicóticos parecem ter efeito sobre o organismo de maneira independente do sistema nervoso central. Primeiro, já foi demonstrado que olanzapina causa disfunção do metabolismo de glicogênio e da sinalização da insulina em linhagem de célula muscular quando comparado a amisulprida (ENGL et al., 2005). Segundo, foi demonstrado que clozapina e olanzapina reduzem a liberação de insulina induzida por via colinérgica através do bloqueio muscarínico ( $M_3$ ), o que não ocorre com risperidona e ziprasidona (JOHNSON et al., 2005). E, por último, alguns antipsicóticos atípicos induzem resistência a insulina em cultura celular de adipócitos, alterando a lipogênese e a lipólise em favor do acúmulo de lipídeos (MINET-RINGUET et al., 2007; VESTRI et al., 2007). Portanto, esses estudos parecem indicar os mecanismos pelos quais o uso de antipsicóticos atípicos desequilibram o metabolismo energético, promovendo ganho de peso, dislipidemia e diabetes.

Aproveitando as diferenças de ganho de peso entre os antipsicóticos, vários estudos têm tentado correlacionar o perfil farmacológico desses fármacos e os efeitos metabólicos (Tabela 4). Uma meta-análise demonstrou que o antagonismo do receptor de histamina  $H_1$  foi o alvo mais correlacionado com o ganho de peso seguido pelos receptores  $\alpha_{1a}$ ,  $5-HT_{2C}$  e  $5-HT_6$  (KROEZE et al., 2003). Corroborando essa hipótese, foi demonstrado que antipsicóticos atípicos (clozapina, olanzapina, quetiapina e risperidona), mas não ziprasidona, ativam seletivamente a enzima hipotalâmica AMPK (proteína ativada por AMP) através do bloqueio do receptor  $H_1$  (KIM et al., 2007). Esses dados estão de acordo com o papel central da histamina (BROWN; STEVENS; HAAS, 2001) e da AMPK (MINOKOSHI et al., 2004) no controle do consumo de alimento.

Em todos os casos, o hipotálamo possui um papel central na regulação do metabolismo energético, controlando várias funções como apetite, temperatura corporal, saciedade e metabolismo basal. Embora os antipsicóticos não possuem afinidade com nenhum dos receptores peptidérgicos envolvidos diretamente com a regulação hipotalâmica (THEISEN et al., 2007), sabe-se que

a serotonina, histamina e dopamina controlam a atividade dos núcleos hipotalâmicos e, por consequência, o metabolismo energético (REYNOLDS; KIRK, 2010). Por exemplo, sabe-se que agonistas do receptor serotoninérgico 5-HT<sub>2C</sub>, como a fenfluramina, reduzem o consumo de alimento através da ativação desse receptor em núcleos hipotalâmicos (XU et al., 2008). Portanto, seria esperado que fármacos que bloqueiem o receptor 5-HT<sub>2C</sub> no hipotálamo levem ao efeito oposto, causando um aumento do consumo de alimento.

Não por acaso, os dois antipsicóticos atípicos mais associados a efeitos metabólicos, clozapina e olanzapina, são potentes antagonistas de 5-HT<sub>2C</sub>. Corroborando essa hipótese, ratos que foram tratados com antagonistas desse receptor (SB243213) apresentaram aumento de peso maior que o controle, mas menor que animais tratados com olanzapina (KIRK et al., 2009). Entretanto, quando o antagonismo serotoninérgico foi combinado com haloperidol, um antagonista potente do receptor D<sub>2</sub>, os ratos ganharam ainda mais peso, de maneira similar aos ratos tratados com olanzapina. No mesmo estudo, quando mepiramina, um antagonista do receptor H<sub>1</sub>, foi utilizado no lugar de haloperidol, o aumento adicional de peso não ocorreu, sugerindo que os receptores D<sub>2</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> participam em conjunto no ganho de peso. Dessa forma, esses estudos demonstram a participação de vários receptores no controle da homeostase energética, e que a resposta fisiológica dessa interação é de difícil predição.

A dificuldade de estudar os efeitos metabólicos causados por antipsicóticos exige que sejam desenvolvidos modelos pré-clínicos capazes de avaliar de antemão o potencial desses efeitos. Esses modelos deverão ser capazes de avaliar o efeito metabólico dos fármacos em um sistema *in vivo*, porém de maneira mais simples que os métodos utilizados em roedores. Portanto um modelo alternativo, como o peixe zebrafish, tem sido utilizado para tentar avaliar o efeito de fármacos no metabolismo energético (SCHLEGEL; STAINIER, 2007).

#### **1.2.4 Modelos comportamentais no estudo de antipsicóticos**

A validade de um modelo comportamental é essencial no desenvolvimento de medicamentos e nos estudos dos mecanismos de ação. Esse processo é dividido em validade preditiva, validade fenomenológica e validade construída (MICZEK; DE WIT, 2008). Na validade preditiva, o modelo deverá prever o efeito terapêutico em humanos; na validade fenomenológica, o modelo deverá apresentar sintomas clínicos similares aos apresentados em humanos; e, por último, na validade construída, o modelo deverá reproduzir os fatores etiológicos da doença. No caso da descoberta de fármacos, o modelo mais utilizado é o modelo preditivo, por ser mais simples e direto.

Para isso, os psicofarmacologistas têm avançado consideravelmente no desenvolvimento de modelos animais que predizem os efeitos terapêuticos de medicamentos. Nos modelos tradicionais de estudo dos efeitos comportamentais de antipsicóticos, o foco tem sido direcionado para os sintomas clássicos da esquizofrenia (sintomas positivos, negativos e cognitivos) e os efeitos colaterais induzidos por antipsicóticos (Tabela 5) (PORSOLT; MOSER; CASTAGNÉ, 2010).

**Tabela 5.** Modelos comportamentais em roedores para antipsicóticos típicos e atípicos. Dados compilados (GEYER; ELLENBROEK, 2003; PORSOLT; MOSER; CASTAGNÉ, 2010).

	<b>Modelo</b>	<b>Resposta de antipsicóticos</b>
<b>Sintomas positivos</b>		
- Hiperatividade locomotora - Movimentos repetitivos (estereotípicos)	- Tratamento agudo com agonistas dopaminérgicos e antagonistas de NMDA leva a aumento da atividade locomotora e de movimentos estereotípicos.	- Antipsicóticos atípicos revertem principalmente hiperatividade locomotora, enquanto os antipsicóticos típicos inibem ambos comportamentos.
- Comportamento de escalada	- Tratamento agudo com apomorfina ou anfetamina induz comportamento de escalada.	- Antipsicóticos atípicos e típicos reduzem comportamento de escalada

<p><b>Sintomas negativos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Nado forçado</li> <li>- Interação social</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tratamento com PCP aumenta tempo de imobilização; pode representar o embotamento afetivo.</li> <li>- Tratamento agudo e crônico com antagonistas de NMDA reduz interação social; pode representar déficit social.</li> </ul>	<p>Antipsicóticos atípicos revertem o efeito, mas não os antipsicóticos típicos</p> <p>Alguns antipsicóticos atípicos revertem o efeito, mas não os antipsicóticos típicos</p>
<p><b>Sintomas Cognitivos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Resposta de esquiva condicionada</li> <li>- Reconhecimento de objeto</li> <li>- Labirinto aquático de Morris</li> <li>- Inibição por pré-pulso</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Animais são treinados para prevenir um estímulo aversivo ao realizar um comportamento específico.</li> <li>- Tratamento com PCP reduz reconhecimento de objeto, indicando déficit de memória similar ao encontrado em pacientes esquizofrênicos.</li> <li>- PCP reduz memória espacial.</li> <li>- Tratamento com agonistas dopaminérgicos e antagonistas de NMDA leva à redução da reação de reflexo a estímulo forte após pré-exposição por estímulo fraco.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Antipsicóticos atípicos e típicos reduzem comportamento da resposta condicionada.</li> <li>- Antipsicóticos atípicos clozapina e risperidona revertem o efeito, mas não haloperidol.</li> <li>- Clozapina e outros antipsicóticos atípicos revertem efeito, mas não haloperidol.</li> <li>- Reversão por antipsicóticos típicos e alguns atípicos.</li> </ul>
<p><b>Sintomas extrapiramidais</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Comportamento cataléptico, movimento mastigatório, retração de pata</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Comportamento induzido apenas por antipsicóticos típicos.</li> </ul>

Os sintomas positivos são caracterizados por alucinações, delírios e agitação. Logicamente, desenvolver modelos que reflitam os sintomas de alucinação e delírio é praticamente impossível. Portanto, os modelos comportamentais focam

principalmente no aspecto motor da agitação, que é facilmente avaliado em roedores. Para reproduzir os movimentos estereotípicos encontrados nos surtos psicóticos, utilizam-se agentes farmacológicos que mimetizem o estado cerebral do paciente no surto psicótico (GEYER; ELLENBROEK, 2003). Esses indutores de movimentos estereotípicos (movimentos repetitivos) e de hiperatividade (atividade locomotora aumentada) podem ser de três classes: agonistas diretos ou indiretos da via dopaminérgica; agonistas de receptores de serotonina (5-HT); e antagonistas competitivos do receptor de glutamato NMDA.

Quando administrados a roedores, agonistas dopaminérgicos como apomorfina, cocaína e anfetamina podem induzir hiperatividade em doses moderadas e movimento estereotípico em doses altas. Aparentemente, esse comportamento apresenta validade preditiva porque pacientes esquizofrênicos desenvolvem sintomas similares sob efeito de agonistas dopaminérgicos (CURRAN; BYRAPPA; MCBRIDE, 2004). Embora todos os antipsicóticos clássicos consigam inibir a hiperatividade e as estereotipias induzidas por anfetamina, a clozapina parece ser menos eficaz contra movimentos repetitivos (O'NEILL; SHAW, 1999). Como os movimentos estereotípicos são induzidos pela ativação de receptores no estriado (área motora), sugere-se que a clozapina bloqueie preferencialmente a área límbica (nucleus accumbens) em relação a área motora (LEITE; GUIMARÃES; MOREIRA, 2008). Isso indica que fármacos que tenham propensão em inibir predominantemente a hiperatividade em detrimento dos movimentos estereotípicos tenham menor chance de induzir EPS em pacientes.

O uso de antagonistas do receptor NMDA levam a sintomas positivos muito semelhantes aos induzidos por agonistas dopaminérgicos. Os antagonistas como cetamina, fenciclidina e dizocilpina (MK-801) agem de maneira não competitiva no receptor NMDA, sendo usados como drogas de recreação por humanos. Os efeitos comportamentais podem ser revertidos por antipsicóticos, embora os antipsicóticos atípicos como clozapina, aripiprazol e olanzapina

sejam mais eficazes que os antipsicóticos típicos na reversão dos efeitos de hiperatividade e movimentos estereotípicos (LEITE; GUIMARÃES; MOREIRA, 2008).

Além dos sintomas positivos, os antipsicóticos atípicos seletivamente revertem vários outros efeitos induzidos por antagonistas de NMDA (TSAI; COYLE, 2002). Por exemplo, clozapina e olanzapina, mas não haloperidol e racloprida, inibem os efeitos da fenciclidina na ativação neuronal em fatias de cérebro (WANG; LIANG, 1998) e atenuam os déficits no comportamento de inibição por pré-pulso em ratos (BAKSHI; SWERDLOW; GEYER, 1994). Embora os antipsicóticos atípicos sejam mais eficazes em antagonizar os efeitos induzidos por antagonistas de receptor de NMDA, nenhum possui afinidade com o receptor NMDA. O efeito superior dos antipsicóticos atípicos em reverter os efeitos de antagonistas de NDMA não está bem estabelecido, mas parece estar ligado ao bloqueio múltiplo de subtipos de receptores de serotonina (MELTZER; HORIGUCHI; MASSEY, 2011).

Os agonistas de receptor de serotonina são conhecidos alucinógenos (ácido lisérgico dietilamida, psilocibina e mescalina). As alucinações são geralmente visuais, mas também apresentam outros sintomas positivos que podem ser avaliados em animais. Por exemplo, a mescalina induz um intenso comportamento de arranhar em algumas linhagens de camundongo, e esse efeito pode ser inibido por antipsicóticos, especialmente os que antagonizam o receptor 5-HT<sub>2</sub> (PORSOLT; MOSER; CASTAGNÉ, 2010). Entretanto, o agonismo de serotonina não reproduz grande parte dos sintomas característicos da esquizofrenia, e os fármacos que antagonizam os efeitos comportamentais parecem indicar mais uma atividade anti-serotoninérgica do que antipsicótica.

Um dos modelos mais antigos para avaliar a ação de fármacos antipsicóticos é o da resposta de esquiva condicionada (NIEMEGEREERS; JANSSEN, 1965), considerado um indicador seletivo e sensível de atividade antipsicótica

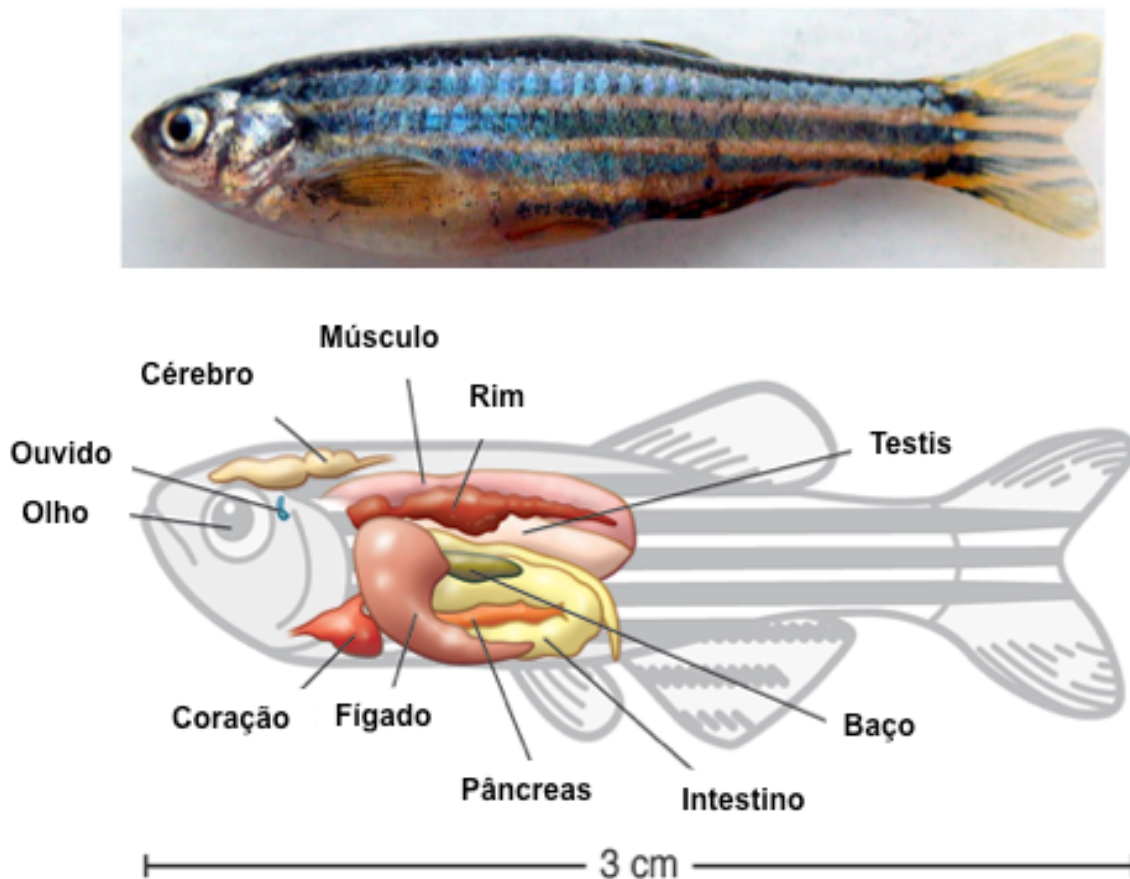
(WADENBERG; HICKS, 1999). Nesse modelo, os roedores são treinados a realizar um comportamento específico (esquiva) em resposta a um estímulo aversivo. O comportamento de esquiva pode ser tanto ativo (subir em uma área) quanto passivo (não entrar em compartimento mais atrativo). Sabe-se que grande parte dos antipsicóticos, tanto os típicos como atípicos, antagoniza o comportamento normal de esquiva (WADENBERG; HICKS, 1999). Entretanto, a clozapina apresenta uma resposta bifásica, aumentando a resposta de esquiva em doses baixas e inibindo a resposta em doses altas (BARRETT, 1982). Outro modelo clássico é o de indução de escalada por agonistas dopaminérgicos, tal como apomorfina (PROTAIS; COSTENTIN; SCHWARTZ, 1976). Tanto antipsicóticos típicos como atípicos são eficazes em inibir esse comportamento (CORBETT et al., 1993; VASSE et al., 1985).

O uso de modelos comportamentais tradicionais no estudo de ação de fármacos é uma estratégia bastante eficaz. Entretanto, os modelos tradicionais são dispendiosos, demandam muito tempo e são mais difíceis de serem replicados devido às variações dos componentes ambientais e à complexidade dos roedores. Além disso, os modelos tradicionais não são facilmente avaliados em grande escala e, portanto, não é possível avaliar centenas de compostos. Por causa desses entraves, grande parte da descoberta de novos fármacos tinha sido direcionada para estudos *in vitro* (BUTCHER; BERG; KUNKEL, 2004). No entanto, vários estudos recentes têm tentado desenvolver métodos para estudos em grande escala baseados em fenótipo utilizando modelos alternativos como zebrafish e *C. elegans* (KOKEL et al., 2012).

### **1.3 *Danio rerio***

O peixe zebrafish (Figura 4), *Danio rerio* (Hamilton, 1822), é um importante modelo animal utilizado nas áreas de biologia de desenvolvimento, genética e biomedicina (GRUNWALD; EISEN, 2002). O uso do zebrafish como modelo experimental ganhou proeminência na década 80 quando George Streisinger

estava à procura de um animal vertebrado diploide para aplicar as recém-desenvolvidas técnicas de genética molecular (STREISINGER et al., 1981). Entretanto, a força do zebrafish como modelo experimental deu um salto com o primeiro projeto em grande escala para a identificação de mutantes em vertebrados (GRANATO; NÜSSLEIN-VOLHARD, 1996). O projeto avaliou mais de 4000 mutações, sendo que mais de 400 estavam ligadas ao desenvolvimento embriológico de vertebrados.



**Figura 4.** Peixe zebrafish adulto. **Acima** – Foto de peixe zebrafish adulto mostrando o padrão de listras característicos da espécie. **Abaixo** – Desenho esquemático demonstrando a anatomia interna dos órgãos presentes em um peixe adulto. Adaptado (SANTORIELLO; ZON, 2012)

Após vários avanços tecnológicos, teve início em 2001 o projeto genoma zebrafish pelo Wellcome Trust Sanger Center do Reino Unido que foi finalizado somente neste ano (HOWE et al., 2013). O genoma do zebrafish possui a



particularidade de apresentar duplicação de vários genes. Comparado a outros vertebrados, o ancestral do grupo de peixes teleósteos apresentou uma duplicação genômica adicional (MEYER; SCHARTL, 1999). Isso explica os mais de 26000 genes que codificam proteínas encontradas no genoma do zebrafish, mais que qualquer genoma de vertebrados sequenciados até hoje. Cerca de 71% dos genes humanos possuem um ortólogo em zebrafish, sendo que 47% possuem uma relação de um para um, ou seja, não existem versões duplicadas no zebrafish (HOWE et al., 2013). O conhecimento completo do genoma do zebrafish facilita a manipulação genética e o desenvolvimento de modelos de doenças, competindo com outros modelos tradicionais.

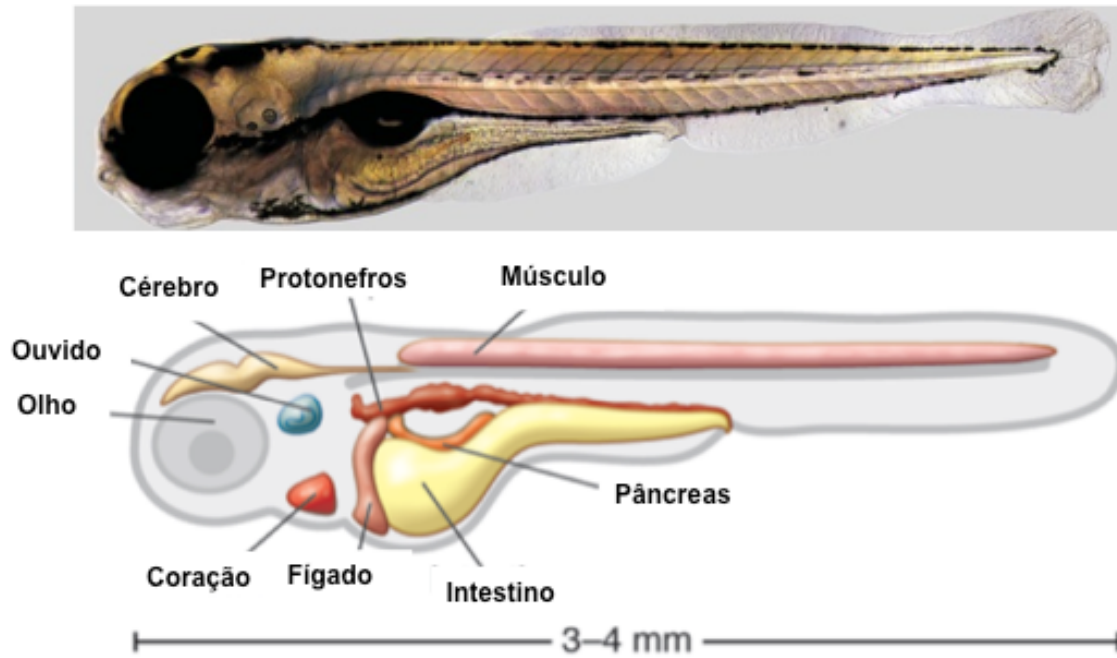
O zebrafish apresenta as vantagens de modelos de invertebrado (e.g., *Drosophila*), tal como reprodução em grande quantidade e tamanho pequeno. Ao mesmo tempo, por serem vertebrados, possuem maior afinidade com mamíferos que animais invertebrados, apresentando grande similaridade morfológica e genética. Essas qualidades tornam o zebrafish um excelente modelo quando a complexidade de modelos mamíferos não é necessária.

### **1.3.1 Biologia do zebrafish**

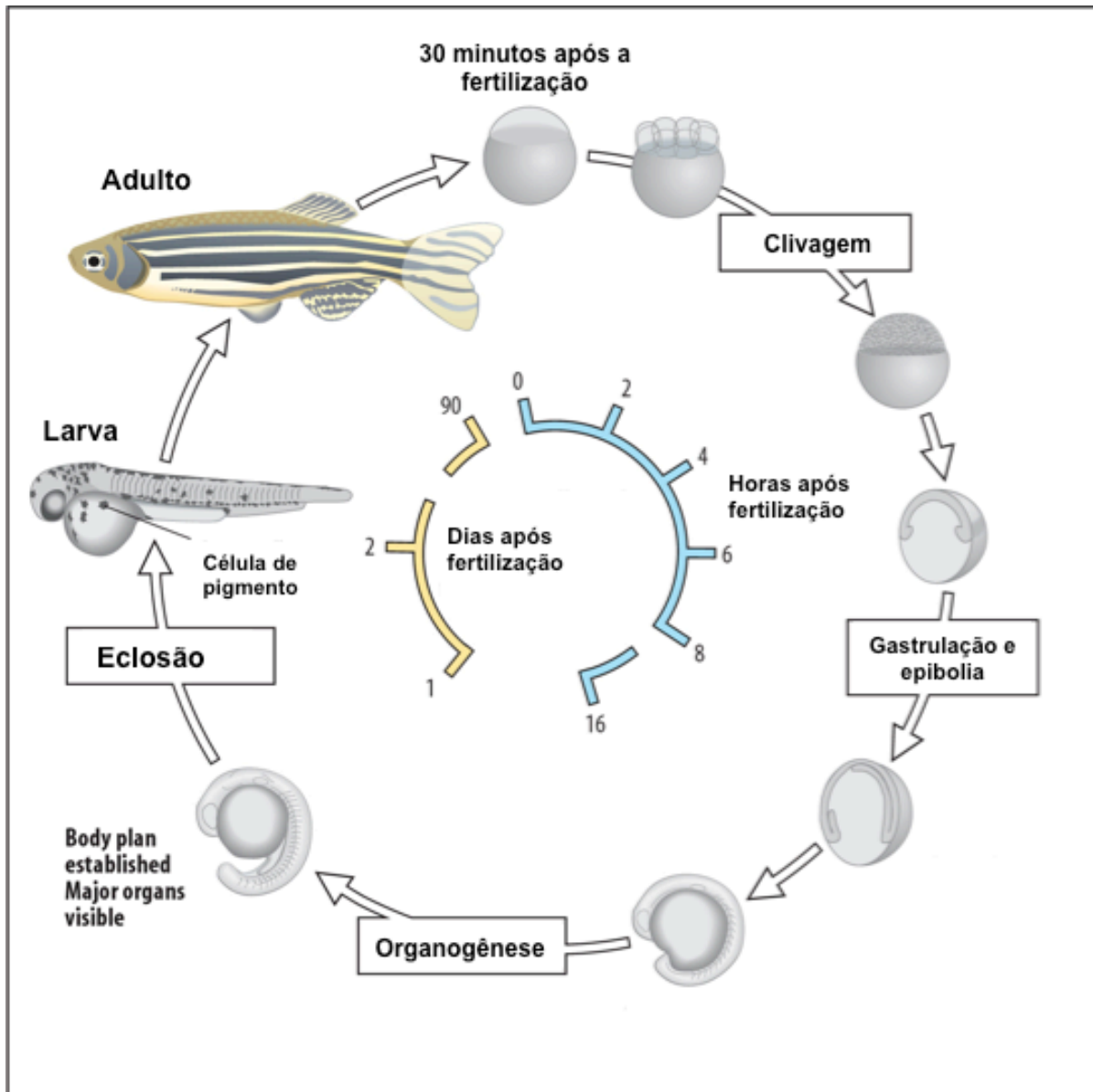
O zebrafish é um peixe teleósteo de água doce da classe Actinopterygii (peixes com raios nas barbatanas), que pertence à família Cyprinidae. A espécie é encontrada no sul e sudeste asiático, regiões que apresentam clima tropical. O zebrafish vive naturalmente em águas rasas com pouca correnteza, tipicamente em regiões alagáveis associadas às plantações de arroz. O nome do gênero *Danio* vem da língua Bengali que significa “do campo de arroz”, indicando o habitat preferencial do zebrafish. A alimentação é tipicamente onívora, e sua dieta natural consiste principalmente de zooplâncton, fitoplâncton e insetos. O zebrafish apresenta comportamento social; os peixes se agrupam em cardume e mantém relação de dominância e submissão entre os indivíduos (SPENCE et al., 2008). As características que distinguem o zebrafish como uma espécie são

uma linha lateral incompleta que se estende até a base da barbatana anal, dois pares de bigodes e de cinco a sete listras de cor azul escura que se estendem a partir do opérculo até a região da barbatana anal. O padrão de cor é determinado por três tipos de células de pigmento: melanóforos de cor azul escuro, xantóforos de cor dourada e iridóforos de aspecto iridescente (PARICHY, 2006).

O zebrafish possui várias vantagens que o torna um excelente modelo experimental. Os adultos são animais pequenos (3 cm em média) e de poucos cuidados permitindo a criação de grande número de peixes em pouco espaço. Em condições apropriadas de laboratório, os peixes podem reproduzir o ano inteiro, com as fêmeas ovipondo centenas de ovos toda semana. Como a fertilização é externa, e os ovos são transparentes e grandes (0.7 mm), pode-se acompanhar inteiramente o desenvolvimento do embrião utilizando um estereomicroscópio simples. O zebrafish tem a capacidade de desenvolver de forma rápida. Os precursores de todos os órgãos já estão presentes 36 horas após a fertilização (KIMMEL et al., 1995). No quinto dia após fertilização (dpf), a maioria dos tecidos está desenvolvida (Figura 5) e a larva já apresenta comportamento independente. Didaticamente as fases do zebrafish são: 0 a 2 dpf (embrião), 3 a 30 dpf (larva), 30 a 90 dpf (juvenil). A fase adulta ocorre após três meses de idade quando o zebrafish se torna sexualmente maduro (Figura 6).



**Figura 5.** Larva de zebrafish. **Acima** – Foto de larva de zebrafish de 4-5 dias após fertilização. **Abaixo** – Desenho esquemático demonstrando a anatomia interna dos órgãos presentes na larva. Notar que maior parte dos órgãos já está presente nesta fase. Adaptado (SANTORIELLO; ZON, 2012).

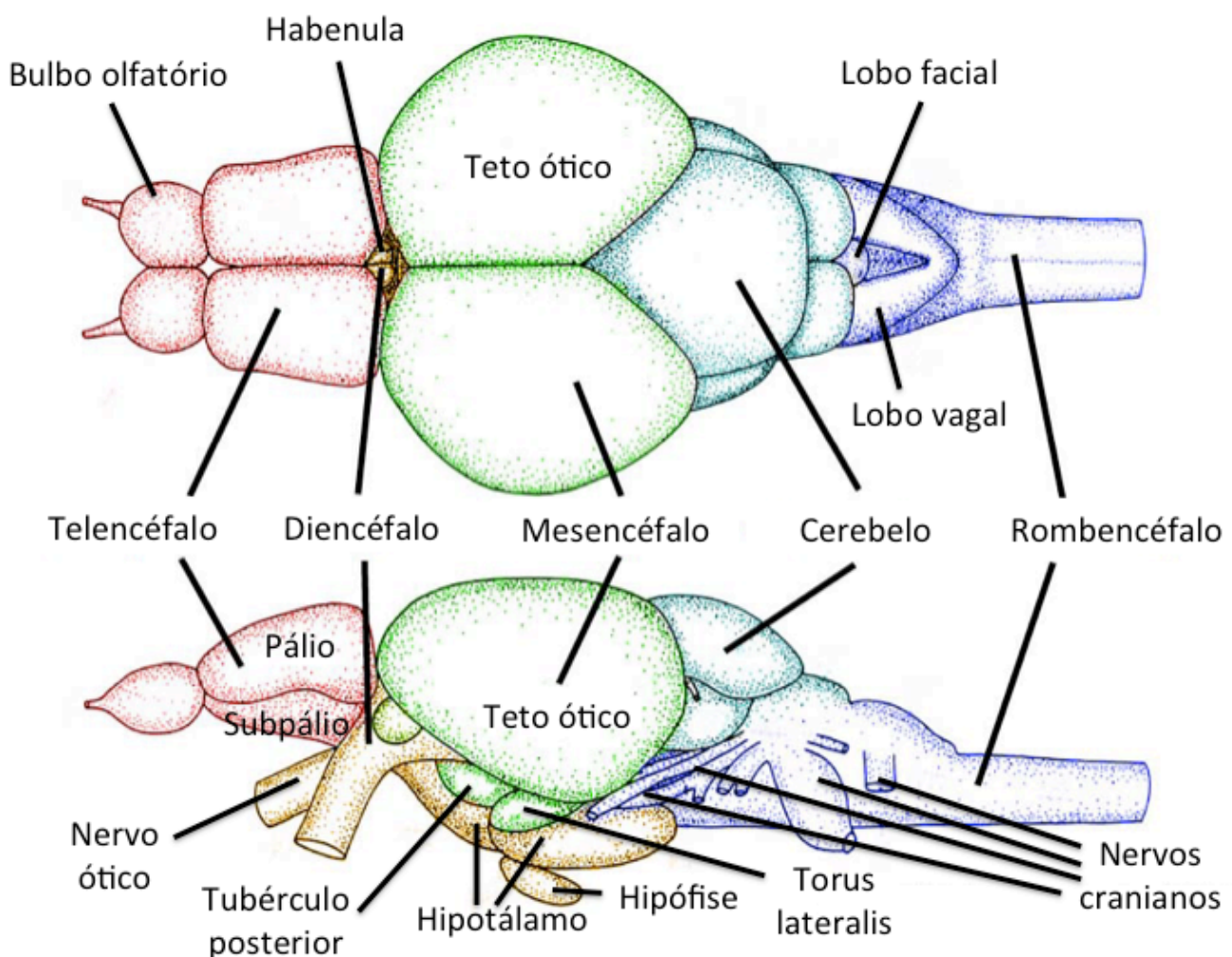


**Figura 6.** Ciclo de vida do peixe zebrafish. O desenvolvimento do zebrafish ocorre de forma rápida; a clivagem, gastrulação e organogênese ocorrem em 24 horas. Em 2-3 dias após a fertilização, as larvas eclodem já apresentando células de pigmento. Após passar por fase juvenil, o zebrafish torna-se adulto 90 dias após a fertilização.

### 1.3.2 Sistema nervoso do zebrafish

O cérebro do zebrafish adulto (Figura 7) possui 4.5 mm de comprimento (RUPP; WULLIMANN; REICHERT, 1996), enquanto o cérebro da larva (5 dpf) apresenta 1.5 mm de comprimento e 0.5 mm de espessura. O cérebro de um teleosteo é

formado pela mesma organização básica de um vertebrado sendo dividido em prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo (Tabela 6), sendo que esses domínios são posteriormente segmentados em estruturas especializadas. Os peixes teleósteos apresentam regiões cerebrais semelhantes a outros vertebrados tais como retina, bulbo olfatório, cerebelo e medula espinhal. Entretanto, outras regiões tal como o teto ótico e o telencéfalo apresentam diferenças mais pronunciadas que surgem ao longo do desenvolvimento do prosencéfalo (WILSON; HOUART, 2004).



**Figura 7.** Cérebro de um zebrafish adulto mostrando as principais subdivisões cerebrais. Adaptado (WULLIMANN; RUPP; REICHERT, 1996).

**Tabela 6.** Organização regional de cérebro de vertebrados.

<b>Prosencéfalo</b>	Telencéfalo	Bulbo Olfatório			
		Pálio	Olfatório Sensorial Límbico		
	Diencefalo	Subpálio	Estriado Septo		
		Epitálamo	Habenula Glândula pineal		
		Tálamo			
		Hipotálamo			
		Vesícula ótica			
		<b>Mesencéfalo</b>	Mesencéfalo	Teto	Teto ótico Torus semicircularis
				Segmento	Núcleo vermelho Substantia nigra
			Istmo	Locus coeruleus Núcleo da rafe	
<b>Rombencéfalo</b>	Metencéfalo	Ponte Cerebelo			
	Mielencéfalo	Medula			

O telencéfalo de teleósteos apresenta uma parte dorsal chamada de pálio e uma parte ventral chamada de subpálio. O pálio é homólogo às estruturas corticais, mas não desenvolve camadas definidas como o neocórtex em mamíferos (ITO; YAMAMOTO, 2009). A morfologia do telencéfalo de teleósteos difere substancialmente de amniotas porque o telencéfalo passa por um processo morfogenético (eversão) que realoca zonas dorsais do neurotubo para posições laterais (WULLIMANN; MUELLER, 2004). A análise da expressão genética e das projeções entre as regiões cerebrais sugere homologias entre o desenvolvimento do telencéfalo em mamíferos e teleósteos (WULLIMANN;

MUELLER, 2004). Para as regiões do pálido, há homologias entre o paleocórtex de mamíferos (córtex olfatório) e a zona posterior do pálido em peixes, entre o arquicórtex (hipocampo) e a zona ventrolateral e dorsal do telencéfalo (pálido medial), e também entre a amígdala cortical e o pálido ventral. Para as regiões do subpálido de teleósteos, tem sido proposta uma homologia com as eminências gangliônicas, correspondendo ao estriado/pálido em mamíferos (MUELLER; WULLIMANN, 2009).

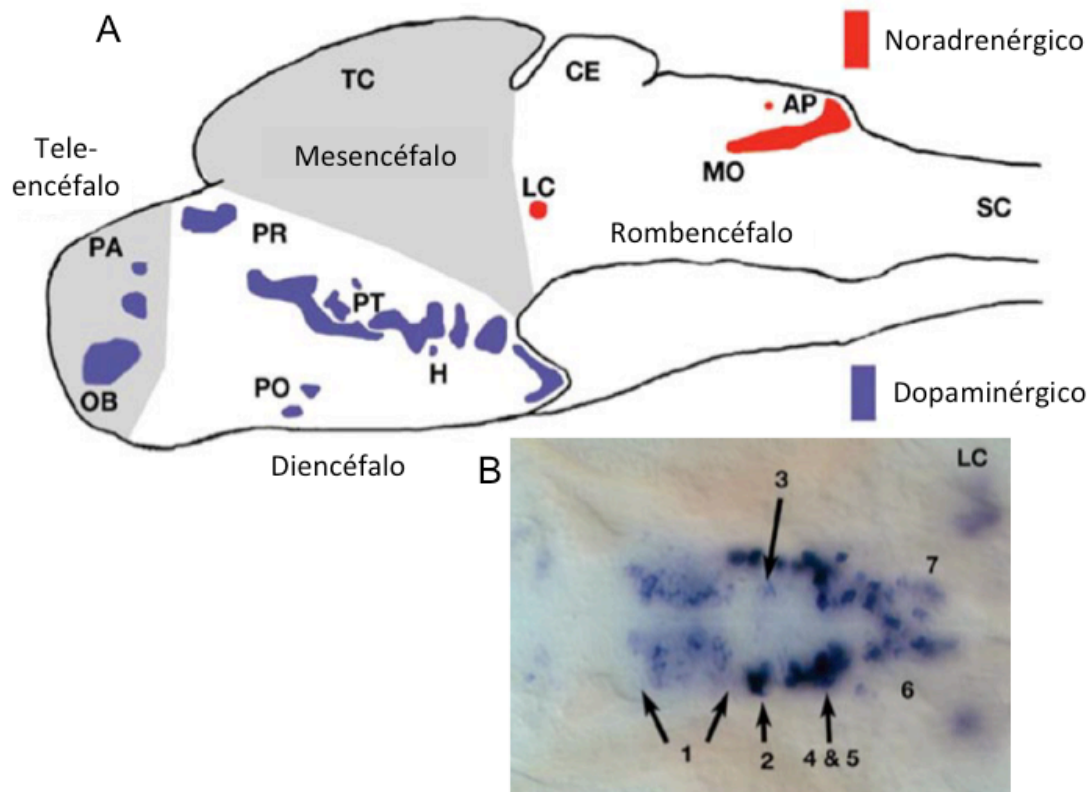
O sistema visual de teleósteos também apresenta diferenças em comparação com o de mamíferos. Nos peixes, ao invés das células ganglionares da retina projetarem para o colículo superior, como em mamíferos, as projeções são destinados ao teto ótico (BURRILL; EASTER, 1994). Comparado com colículo superior, a arquitetura do teto ótico parece ser mais complexa, contendo sete camadas de células distintas. Uma das razões para essa complexidade é que o teto ótico realiza o processamento visual em teleósteos, enquanto em mamíferos ao processamento ocorre no neocórtex (córtex visual).

Outra região que apresenta diferenças marcantes nos peixes teleósteos é o diencéfalo. Nesta região, se encontram vários agrupamentos de neurônios dopaminérgicos, os quais nos mamíferos são localizados predominantemente no mesencéfalo (HOLZSCHUH et al., 2001; SMEETS; GONZÁLEZ, 2000). De forma similar aos vertebrados amniotas, os grupos de neurônios dopaminérgicos têm sido descritos no zebrafish adulto nas seguintes regiões cerebrais: bulbo olfatório, subpálido e diencéfalo ventral, incluindo o hipotálamo (MCLEAN; FETCHO, 2004; RINK; WULLIMANN, 2001). Nos estágios larvais, grande parte dos neurônios dopaminérgicos se localiza na parte ventral do diencéfalo e podem ser classificados em grupos de acordo com a localização e a morfologia: tálamo ventral (grupo 1); tubérculo posterior (grupos 2 e 4); hipotálamo medial (grupo 3) e hipotálamo lateral (grupos 5 e 6) (RINK; WULLIMANN, 2002) (Figura 8).

Os grupos dopaminérgicos em mamíferos são numerados em ordem da região caudal (A1) até a rostral (A17) e podem ser comparados em relação ao zebrafish com base na anatomia e marcadores moleculares. De forma homóloga aos neurônios A11 em mamíferos, os neurônios dopaminérgicos diencefálicos no zebrafish DC2 e DC4-6 apresentam o marcador molecular Orthopedia (KASTENHUBER et al., 2010). Os outros grupos dopaminérgicos do zebrafish correspondem às regiões do hipotálamo (A12, A14-15) e tálamo ventral (A13) em mamíferos.

A análise do sistema catecolaminérgico do zebrafish (dopamina, noradrenalina e adrenalina) é principalmente baseada na avaliação da expressão da enzima tirosina hidroxilase por meio de anticorpos (imunohistologia) ou do seu RNAm (*th*) cognato (hibridização *in situ*) no sistema nervoso de zebrafish. A tirosina hidroxilase é a enzima limitante na síntese de catecolaminas, convertendo o aminoácido tirosina em dihidroxifenilalanina. A primeira detecção desta enzima se dá antes do primeiro dia de desenvolvimento (MCLEAN; FETCHO, 2004; RINK; WULLIMANN, 2001). A partir dessa expressão, verificou-se que os neurônios noradrenérgicos se localizam em regiões similares às encontradas em mamíferos, sendo encontrados no Locus coeruleus, medula oblonga e área postrema (MA, 1997) (Figura 7).





**Figura 8.** Agrupamento de neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos no sistema nervoso central de larva de zebrafish com 4 dpf. A) Desenho esquemático (visão lateral) mostrando as principais subdivisões cerebrais e as localizações dos grupos catecolaminérgicos. B) Detecção do RNAm da *tirosina hidroxilase* (*th*) por técnica de hibridização *in situ* em tecido intacto. Visão dorsal do embrião na região do diencéfalo. Numeração dos grupos de neurônios dopaminérgicos de 1 a 7 (RINK; WULLIMANN, 2002). Abreviações: AP – Área postrema; CE – Cerebelo; H – Hipotálamo; LC – Locus coeruleus; MO – Medula oblongata; OB: Bulbo olfatório; PA: Pálio; PO: Área pré-ótica; PR: Pré-teto; PT: Tubérculo posterior; TC: Teto; SC: Medula espinhal. T – Telencefalo; D: Diencéfalo. Adaptado (SCHWEITZER; DRIEVER, 2009).

Além de possuir um sistema catecolaminérgico desenvolvido, o zebrafish também apresenta outros sistemas de neurotransmissão (receptores, neurotransmissores e moléculas relacionadas) encontrados em mamíferos, incluindo os aminoácidos (glutamato, GABA e glicina) (HIGASHIJIMA; MANDEL; FETCHO, 2004; HOPPMANN et al., 2008), outras monoaminas (histamina, serotonina e melatonina) (KASLIN; PANULA, 2001; LILLESAAAR, 2011) e acetilcolina (MUELLER; VERNIER; WULLIMANN, 2004). A revisão detalhada de cada um desses neurotransmissores com seus receptores no zebrafish está

além do escopo desta tese. Portanto, foi criada uma tabela com o intuito de estabelecer uma relação entre os sistemas de neurotransmissão monoaminérgica de mamíferos e do zebrafish (Tabela 7).

**Tabela 7.** Receptores de monoaminas tanto em mamíferos e no zebrafish.

Sistema	Receptores em mamíferos	Receptor em zebrafish	Referências
Dopamina	Tipo D <sub>1</sub> : D <sub>1</sub> /D <sub>5</sub>	Drd1	(LI et al., 2007)
	Tipo D <sub>2</sub> : D <sub>2</sub> /D <sub>3</sub> /D <sub>4</sub>	Drd2a/Drd2b/Drd2c; Drd3, Drd4a/Drd4b/Drd4c	(BOEHMLER et al., 2004, 2007)
Noradrenalina	$\alpha_{1A}/\alpha_{1B}/\alpha_{1D}$	Previsto	Ensembl
	$\alpha_{2A}/\alpha_{2B}/\alpha_{2C}$	$\alpha_{2A}/\alpha_{2B}/\alpha_{2C}$ e receptores adicionais $\alpha_{2Da}$ e $\alpha_{2Db}$	(RUUSKANEN et al., 2004, 2005)
	$\beta_1; \beta_2; \beta_3$	$\beta_1; \beta_{2a}/\beta_{2a}; \beta_{3a}$ e $\beta_{3b}$	(WANG et al., 2009)
Serotonina	5-HT <sub>1A</sub> /5-HT <sub>1B</sub> /5-HT <sub>1D</sub> / 5-HT <sub>1E</sub> /5-HT <sub>1F</sub> /	5-HT <sub>1Aa</sub> , 5-HT <sub>1Ab</sub> ; 5-HT <sub>1bd</sub>	(NORTON; FOLCHERT; BALLY-CUIF, 2008)
	5-HT <sub>2A</sub> /5-HT <sub>2B</sub> /5-HT <sub>2C</sub>	Previsto: 5-HT <sub>2A</sub> /5-HT <sub>2B</sub> 5-HT <sub>2C</sub>	(SCHNEIDER et al., 2012)
	5-HT <sub>3</sub>	Previsto	Ensembl
	5-HT <sub>4</sub> /5-HT <sub>6</sub> /5-HT <sub>7</sub> /	Previsto	Ensembl
	5-HT <sub>5A</sub> /5-HT <sub>5B</sub>	Previsto	Ensembl
Histamina	H <sub>1</sub> , H <sub>2</sub> e H <sub>3</sub>	H <sub>1</sub> , H <sub>2</sub> e H <sub>3</sub>	(PEITSARO et al., 2007)

### 1.3.3 Comportamento no zebrafish

A partir de 5 dpf, as larvas de zebrafish já apresentam um repertório de comportamentos motores. Isso permite cada larva explorar o ambiente à procura

de comida e esquivar de estímulos externos. As larvas nadam em episódios rápidos e lentos e usam de movimentos de virada específicos para mudar a rota de locomoção (BURGESS; GRANATO, 2007; GAHTAN; TANGER; BAIER, 2005). Além disso, as larvas utilizam os órgãos sensoriais de maneira coordenada em resposta a estímulos visuais, táteis, olfatórios e acústicos. Por exemplo, as larvas apresentam comportamentos simples tais como movimento sacádicos dos olhos (optocinética) (FLEISCH; NEUHAUSS, 2006) e virada em forma de 'C' em resposta a som (BURGESS; GRANATO, 2007). Alguns comportamentos complexos já se encontram nas larvas tais como comportamento optomotor, fototaxia e captura de presa (WOLMAN; GRANATO, 2012) (Tabela 8).

**Tabela 8.** Comportamentos larvais simples e complexos. Adaptado (WOLMAN; GRANATO, 2012).

<b>Comportamentos simples</b>	<b>Descrição</b>
Nado lento	Nado lento para frente com pequeno ângulo de torção, onde a torção máxima ocorre na ponta da cauda.
Nado explosivo	Nado rápido para frente com grande ângulo de torção que ocorre no meio do corpo da larva. Velocidade é dez vezes maior do que no nado lento.
Virada espontânea	Virada lenta com velocidade angular de $\sim 60^\circ$ que acontece espontaneamente.
Virada com torção em 'J'	Virada lenta com velocidade angular de $\sim 30^\circ$ que se inicia com um deslocamento da cauda para um lado; ocorre espontaneamente ou para reorientar a larva em relação à presa.
Virada com torção em 'C'	Virada rápida com velocidade angular de $\sim 120^\circ - 180^\circ$ que se inicia em resposta de fuga à estímulo tátil ou acústico; ocorre com baixa latência ( $< 10$ mseg.).
Virada com torção em 'O'	Virada rápida com velocidade angular de $\sim 180^\circ$ que se inicia na resposta a retirada repentina da luz; ocorre com latência de 100-500 mseg.
<b>Comportamentos complexos</b>	<b>Descrição</b>
Resposta optocinética	Movimento lateral dos olhos ao seguir objeto, seguindo por movimento sacádico uma vez

Resposta optomora	que o objeto some do campo de visão. Nado para frente para seguir um estímulo visual (barras escuras móveis).
Procura de presa	Para capturar a presa a larva reorienta o corpo com viradas espontâneas ou com torsão em forma de 'J' e nada para frente novamente para capturar a presa.
Fototaxia	Positiva: a larva é atraída para fonte de luz com intensidade baixa; Negativa: a larva afasta de fonte luz com intensidade alta.
Resposta de fuga	Em resposta a estímulo a larva inicia uma virada rápida com torsão em 'C' afastando-se do estímulo, seguido por uma pequena torsão e então um nado explosivo para frente.
Controle sensório-motor/ inibição pré-pulso	Estímulo acústico fraco subliminar dado 300 msec. antes do estímulo forte suprime resposta.
Aprendizagem não-associativa	Estímulos repetitivos reduzem resposta a estímulos posteriores.

Além da diversidade comportamental das larvas, vários estudos recentes têm demonstrado a capacidade de se usar o zebrafish adulto no estudo de comportamentos complexos, como recompensa, aprendizado, agressão, ansiedade e relação social (KALUEFF et al., 2013). Entretanto, utilizar o zebrafish adulto apresenta alguns problemas. Primeiro, para chegar até a fase adulta são três meses de desenvolvimento, o que eleva os gastos, dificulta experimentos em grande escala e aumenta a variabilidade entre os indivíduos. Segundo, o repertório de comportamentos torna-se mais complexo o que dificulta o estabelecimento de modelos mais simples e robustos. E, por último, o sistema nervoso torna-se mais difícil de ser avaliado experimentalmente, apresentando um circuito neural mais complexo e com maior número de células no sistema nervoso.

Assim, o uso de larvas de zebrafish com até 7 dpf, facilita o uso experimental do zebrafish se comparado com zebrafish adulto (WOLMAN; GRANATO, 2012). O sistema nervoso é acessível por microscopia *in vivo* porque a larva é relativamente transparente e o tecido nervoso é composto por pequeno número de células. Muitos dos comportamentos inatos da larva refletem uma conexão robusta (*hard-wiring*, em inglês) do sistema nervoso, o que torna possível um

estudo genético de cada módulo comportamental, ao mesmo tempo em que minimiza a influência do ambiente e da experiência adquirida pelos peixes adultos.

Além disso, o estudo comportamental das larvas exige menos manutenção por causa de vários fatores: as larvas podem ser mantidas em altas densidades em pequeno espaço (80 larvas para cada placa de Petri de 100 mm); não há necessidade de alimentação até 7 dpf; o número de larvas produzidas em cada reprodução é alto (100-300 embriões por reprodução). Além do menor cuidado, a variabilidade é reduzida quando se utiliza larvas providas dos mesmos parentais porque diminui a distância genética entre os indivíduos da amostra e também reduz diferenças epigenéticas devido à variabilidade na qualidade do vitelo depositado pelas fêmeas em cada ovo. Portanto, as larvas de zebrafish oferecem uma oportunidade única em realizar experimentos comportamentais em grande escala de forma barata, robusta e eficiente.

#### **1.3.3.1 Comportamento de flotação**

Os peixes teleósteos possuem vários tecidos que são mais densos que a água. Sem mecanismos que compensem essa maior densidade, o peixe provavelmente iria afundar. Em resposta a esse problema, os teleósteos desenvolveram vários mecanismos tais como a síntese de lipídeos de baixa densidade e redução da massa óssea. Entretanto, nenhum órgão foi mais importante para controlar a densidade do peixe do que a bexiga natatória. Ao controlar ativamente o volume de gás presente no interior da bexiga natatória, o peixe pode atingir densidade neutra em relação à água, minimizando o gasto energético para se manter na coluna d'água (SMITH; CROLL, 2011).

A morfologia das bexigas natatórias apresenta grande variação entre os peixes teleósteos (SMITH; CROLL, 2011). Apesar disso, a bexiga natatória de todos teleósteos tem uma origem embriológica comum, se originando do intestino

primitivo. A relação entre a bexiga natatória e o intestino é mantida através de um duto pneumático que liga ambos tecidos, onde o duto termina em uma abertura no esôfago. No caso dos peixes fisoclistos, o duto se perde durante o processo de desenvolvimento, enquanto nos peixes fisóstomos (zebrafish), a conexão é mantida por toda vida. Dessa forma, nos peixes fisoclistos a transferência de gás do sangue para a bexiga natatória é o principal mecanismo pelo qual a bexiga natatória é inflada. O mesmo mecanismo de transferência de gás existe em vários fisóstomos, mas a bexiga natatória pode ser também inflada e desinflada através do duto pneumático. Entretanto, alguns fisóstomos, incluindo o zebrafish, não possuem mecanismos para transferir gás para bexiga natatória, dependendo apenas da passagem de ar pelo duto (FINNEY et al., 2006).

A primeira inflagem da bexiga natatória é um passo importante no desenvolvimento do zebrafish. O comportamento associado a esse processo é chamado comportamento de 'nado para cima', no qual as larvas (3 dpf) nadam em movimentos ascendentes e se fixam no substrato, (borda da placa de Petri, ou pedras e seixos no habitat natural), escalando a lateral até alcançarem a superfície (LINDSEY; SMITH; CROLL, 2010). Na superfície, a larva é capaz de aspirar o ar para dentro da cavidade bucal, e então forçá-lo pelo esôfago rostral e duto pneumático, inflando a bexiga natatória (RIEGER; SUMMERFELT, 1998). A importância desse processo é demonstrada quando larvas de zebrafish não conseguem inflar a bexiga natatória após serem impedidas de ter acesso ao ar (GOOLISH; OKUTAKE, 1999). O processo requer um controle neural fino na coordenação de todos os esfíncteres, músculos e bombas envolvidas. Como tanto o músculo liso quanto o estriado estão envolvido nesse processo, o controle neural pode se dar através de enervação motora branquiomérica e enervação autonômica (FINNEY et al., 2006). Embora esse processo seja importante para o desenvolvimento e o comportamento do zebrafish, sabe-se muito pouco sobre sua fisiologia e controle neural.

No zebrafish, a deflação ocorre através do duto pneumático e parece envolver, ao mesmo tempo, o relaxamento de músculos do esfíncter do duto pneumático e a contração do músculo liso que envolve a bexiga natatória (DUMBARTON et al., 2010; FINNEY et al., 2006; SMITH; CROLL, 2011). De forma interessante, os músculos do esfíncter no zebrafish adulto são enervados por axônios colinérgicos, sendo a única região com atividade acetilcolinérgica na região da bexiga natatória (FINNEY et al., 2006). Na musculatura que envolve a bexiga natatória de peixes adultos, encontram-se axônios positivos para tirosina hidroxilase, sugerindo que a musculatura está sobre controle adrenérgico (DUMBARTON et al., 2010; FINNEY et al., 2006). De fato, receptores beta-adrenérgicos parecem estar envolvidos na contração do músculo liso associado à bexiga natatória, uma vez que a ativação farmacológica leva a sua contração (DUMBARTON et al., 2010).

Além das vias clássicas, foram detectados axônios positivos para serotonina, neuropeptídeo Y (NPY) e polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) na região da bexiga natatória no zebrafish adulto, sugerindo uma regulação mais complexa do processo de inflação e deflação (FINNEY et al., 2006). Enquanto isso, a larva de zebrafish (7 dpf) já apresenta enervação da parede da bexiga natatória, com expressão de NPY no nervo da bexiga e NPY e VIP na região do esfíncter (ROBERTSON, 2007).

O comportamento de flotação possui potencial para ser utilizado como indicador de atividade farmacológica de medicamentos psiquiátricos. Uma vez que a regulação da bexiga natatória depende da atividade do sistema nervoso autônomo e motor, pode-se avaliar o efeito de fármacos através da densidade das larvas. Por sua vez, a densidade pode ser monitorada ao avaliar a altura que os peixes se encontram na coluna de água vertical. Dessa forma, devido o comportamento ser bastante visível, não há demanda de alto nível tecnológico para avaliar a resposta farmacológica, o que facilita a implementação do método.

### 1.3.3.2 Comportamento de camuflagem

Embora grande parte dos comportamentos descritos em larvas de zebrafish envolva atividade motora, há outros fenótipos comportamentais mais sutis que podem ser avaliados. Por exemplo, a camuflagem (mudança de cor de acordo com o ambiente) é um comportamento inato que permite evitar a identificação do animal por predadores e pela presa, além de estar associado à comunicação social (PRICE et al., 2008). Ao invés de alterar o comportamento motor do peixe, a camuflagem manifesta-se como um comportamento das células de pigmento, chamadas de melanóforos, que estão localizadas na derme em larvas de zebrafish. As vesículas de pigmento (melanossomos que armazenam melanina) dessas células podem agregar ou dispersar em resposta a estímulos do ambiente. Em larvas e adultos de zebrafish um ambiente luminoso e de cor clara induz agregação, ao passo que um ambiente com pouca luz e de tonalidade mais escura induz a dispersão das vesículas (LOGAN; BURN; JACKSON, 2006). Essa variação de agregação e dispersão torna o animal mais claro ou escuro, respectivamente, permitindo a camuflagem.

A regulação fisiológica da atividade dos melanóforos é categorizada em dois tipos: regulação direta na qual os melanóforos respondem diretamente à luz e regulação indireta no qual os melanóforos são modulados por fatores humorais e/ou controlados diretamente pelo sistema nervoso (FUJII, 2000). A resposta direta é importante em embriões e larvas quando os melanóforos ainda não estão sobre controle neural ou humoral. Por exemplo, as larvas de zebrafish com 2 dpf apresentam melanossomos que se dispersam na presença de luz, enquanto larvas com 5 dpf apresentam melanossomos que agregam na presença de luz, tal como no peixe adulto (SHIRAKI; KOJIMA; FUKADA, 2010). Neste mesmo estudo, larvas com 5 dpf que tiveram os olhos removidos (enucleação), apresentam corpo muito mais escuro que larvas intactas. Além disso, ao invés dos melanossomos agregarem em resposta ao estímulo



luminoso, passaram a se dispersar na presença de luz. Isso sugere que larvas de zebrafish com 5 dpf utilizam de fotorreceptores oculares para induzir a agregação de melanóforos, indicando um controle neural ou humoral dos melanóforos.

Como parte do controle humoral, os melanóforos da derme são controlados por dois peptídeos, o hormônio estimulador do melanócito do tipo alfa ( $\alpha$ -MSH) oriundo da hipófise (LEE; LERNER, 1956), e o hormônio concentrador de melanócito (MCH) proveniente do hipotálamo (KAWAUCHI; BAKER, 2004). A atividade secretora das células melanotrofas (que expressam  $\alpha$ -MSH) aumenta em resposta a ambiente escuro, tal como os níveis séricos do mesmo hormônio (BAKER; WILSON; BOWLEY, 1984). Na circulação sanguínea, o  $\alpha$ -MSH é capaz de atuar diretamente nos melanóforos induzindo a dispersão dos melanossomos (LOGAN; BURN; JACKSON, 2006).

De forma oposta, ocorre um aumento de expressão de MCH na região do hipotálamo (núcleo tuberal lateral) em ambiente claro, aumentando os níveis séricos de MCH (AMANO; TAKAHASHI, 2009; BERMAN et al., 2009). Esse hormônio atua diretamente nos melanóforos de teleósteos, mas não de anfíbios e répteis, levando à agregação dos melanossomos (FUJII, 2000; LOGAN; BURN; JACKSON, 2006). Além das alterações na pigmentação, descobriu-se que o MCH, em contraste ao  $\alpha$ -MSH, possui um efeito antagônico no apetite e metabolismo energético tanto em peixes como em mamíferos, sugerindo uma relação conservada entre as duas vias (KAWAUCHI; BAKER, 2004; SHIMADA et al., 1998).

Embora a luminosidade do ambiente seja o principal estímulo a modular esses hormônios, outros fatores como estresse, temperatura, podem interferir na resposta. Além disso, vários receptores, canais iônicos e vias de sinalização intracelulares estão envolvidos na modulação desses hormônios (ROUBOS; SCHEENEN; JENKS, 2005), sendo possível modular a resposta utilizando

moléculas exógenas. Por exemplo, foi demonstrado que o tratamento com etanol induz a dispersão de melanossomos em melanóforos de larvas de zebrafish (WAGLE; MATHUR; GUO, 2011). Assim, o sistema de regulação do melanóforo em larvas faz parte de um mecanismo clássico de controle neuroendócrino que pode ser utilizado como ferramenta para avaliar os efeitos de fármacos que atuam no sistema nervoso central e endócrino.

#### **1.3.4 Metabolismo energético em larvas de zebrafish**

Durante os primeiros dias de desenvolvimento do zebrafish, três períodos tróficos podem ser caracterizados. O período endotrófico ocorre até a abertura da boca e o início da alimentação (até 4-5 dpf), no qual o embrião e a larva utilizam exclusivamente os nutrientes oriundos do vitelo encontrado no saco vitelínico. Após a primeira ingestão de alimento, a larva passa por um período chamado endoexotrófico, no qual a larva utiliza tanto nutriente endógeno (vitelo) como exógeno (dieta) (de 4 dpf até 6 dpf). Já a fase exotrófica inicia após a completa absorção do vitelo, período no qual a larva passa a depender inteiramente de nutrientes adquiridos na dieta (após 7 dpf) (POUPARD et al., 2000). O embrião absorve os nutrientes do vitelo através uma interface chamada camada sincicial do trofoblasto. Nesta camada, diversas lipoproteínas e enzimas realizam o transporte de lipídeos a partir do vitelo até as células do embrião. O processo molecular de transporte dos lipídeos é similar ao encontrado na absorção de lipídeos pelo intestino e na mobilização de lipídeos do tecido adiposo (SCHLEGEL; STAINIER, 2007).

O zebrafish possui sistema gastrointestinal homólogo aos humanos (CARTEN; FARBER, 2009). Já com 6 dpf, a larva de zebrafish apresenta fígado, intestino, pâncreas e vesícula biliar (Figura 4). O desenvolvimento do tecido adiposo branco inicia-se logo após a alimentação exógena, apresentando anatomia e marcadores moleculares semelhantes aos adipócitos humanos (FLYNN; TRENT; RAWLS, 2009). Como a anatomia e os processos moleculares são

conservados em relação aos mamíferos, o zebrafish torna-se especialmente útil no estudo do metabolismo de lipídeos.

Com o intuito de explorar o modelo de zebrafish como forma de estudar o metabolismo de lipídios vários corantes lipídicos e análogos fluorescentes foram desenvolvidos. Corantes chamados 'oil red O', Sudan Black B e Nile Red foram inicialmente utilizados para corar acúmulos lipídicos em lâminas histológicas e cultura celular, mas atualmente são também utilizados para visualizar os acúmulos lipídeos no zebrafish (CARTEN; FARBER, 2009). Dentre eles, o corante Nile Red tem a vantagem de poder ser usado tanto em amostras fixadas quanto *in vivo*. Nile Red é uma molécula heterocíclica sem cargas que apenas fluoresce em ambientes hidrofóbicos (GREENSPAN; MAYER; FOWLER, 1985). Lipídeos fluorescem nas cores amarelo para vermelho, dependendo do grau de hidrofobicidade do lipídeo. Quando se usa Nile Red em larvas vivas de zebrafish não ocorre nenhum dano ou deformação aparente nos tecidos, o que permite a análise histológica *in vivo* (FLYNN; TRENT; RAWLS, 2009; JONES et al., 2008; TINGAUD-SEQUEIRA; OUADAH; BABIN, 2011).

Um dos modelos potenciais para o estudo de metabolismo de lipídios em zebrafish é utilizar como indicador a absorção do vitelo pela larva de zebrafish. Dessa forma, um estudo seminal utilizou o corante Nile Red para determinar a quantidade de vitelo presente no saco vitelínico de larvas de zebrafish (de 4 a 7 dpf) em resposta a vários fármacos que interferem no metabolismo de triglicerídeos (JONES et al., 2008). O tratamento com ácido nicotínico, um inibidor potente da lipólise em adipócitos, levou a um aumento no conteúdo de vitelo no saco vitelínico. Ao contrário, o tratamento com resveratrol, um inibidor de síntese de lipídeos, levou uma redução no conteúdo lipídico da larva. As larvas de zebrafish responderam aos fármacos de maneira similar ao demonstrado em humanos, indicando que o zebrafish pode ser usado como modelo animal no estudo de medicamentos com ação no metabolismo de lipídeos.

### 1.3.5 Estudos farmacológicos em larvas de zebrafish

No estudo de fármacos, o zebrafish tem sido utilizado principalmente para estudos de 'screening' (KOKEL; PETERSON, 2008), e estudos pré-clínicos de toxicidade e segurança (HILL et al., 2005). Estudos farmacológicos geralmente usam larvas devido ao rápido desenvolvimento e também porque já apresentam a maioria dos órgãos que estão presentes na fase adulta. Cada larva de zebrafish pode ser acondicionada em um poço contendo apenas 50 µL de meio, reduzindo a quantidade de fármaco utilizado e a necessidade de grandes espaços físicos. Além disso, as larvas absorvem prontamente a maioria das moléculas dissolvidas na água. Até 14 dpf o oxigênio dissolvido na água é transportado principalmente por difusão através do tegumento (SCHWERTE, 2003) (as escamas desenvolvem posteriormente), e essa parece ser a rota mais importante para absorção de moléculas pequenas (ROMBOUGH, 2002).

O zebrafish é bastante tolerante ao DMSO, suportando também outros solventes, como acetona e etanol, porém em concentrações mais baixas (HALLARE et al., 2006). Uma vez que grande parte dos fármacos são diluídos em DMSO, a reduzida sensibilidade à esse solvente faz com que grande variedade de fármacos possa ser administrado no meio onde as larvas se encontram. A absorção por via oral também tem sua importância após a formação da boca no quarto dia após a fertilização (GOLDSMITH, 2004).

As larvas de zebrafish apresentam vários fenótipos que são apropriados ao estudo farmacológico. Uma vez que os fármacos atuam em alvos conservados, o estudo de medicamentos neuropsiquiátricos em larvas não precisa simular o fenótipo completo apresentado em humanos. A ação farmacológica em larvas de zebrafish precisa apenas apresentar sensibilidade e especificidade aos fármacos testados (ZON; PETERSON, 2005). Dentre os fenótipos, pode-se estudar o

efeito dos fármacos psiquiátricos sobre o comportamento da larva e seus efeitos adversos associados.

Vários comportamentos têm sido utilizados no estudo farmacológico, como o ciclo de sono-vigília (APPELBAUM et al., 2009; RIHEL et al., 2010), o aprendizado e memória (WOLMAN et al., 2011), modulação da inibição por pré-pulso (BURGESS; GRANATO, 2007), dentre vários outros. Em um estudo recente, foi avaliado o efeito de milhares de fármacos no reflexo motor em resposta à estímulo visual em larvas de zebrafish (KOKEL et al., 2010). Nesse trabalho, foi desenvolvido um sistema no qual embriões foram submetidos a um estímulo luminoso de alta intensidade. A resposta fotomotora foi avaliada antes, durante e após o estímulo luminoso, criando um código de barras comportamental para classes de fármacos após análise de mais de 14.000 moléculas. A partir desse código comportamental, pôde-se agrupar substâncias que apresentavam código fotomotor semelhante. Essa técnica possibilitou a descoberta de duas novas moléculas que se assemelham aos anticolinesterásicos, ressaltando o potencial do zebrafish na descoberta de novos compostos farmacológicos.

Outros comportamentos mais simples, como atividade locomotora espontânea, podem ser utilizados no estudo de fármacos neuropsiquiátricos. Por exemplo, antidepressivos como a fluoxetina são capazes de reduzir a atividade locomotora basal em larvas (AIRHART et al., 2012), enquanto moléculas destinadas a tratar epilepsia são capazes de inibir convulsão induzida em larvas de zebrafish (BARABAN et al., 2007).

No caso específico de antipsicóticos, há poucos estudos sobre a ação desses medicamentos no comportamento da larva de zebrafish. O primeiro estudo verificou que os antipsicóticos típicos flufenazina e haloperidol foram capazes de reduzir a velocidade média e induzir movimentos estereotipados nas larvas com 7 dpf (GIACOMINI et al., 2006). Entretanto, no mesmo estudo, o antipsicótico

atípico olanzapina não foi capaz de induzir movimentos repetitivos e afetou modestamente a velocidade das larvas, indicando um efeito similar ao encontrado na clínica.

Em outro modelo, foi utilizado o comportamento de inibição por pré-pulso (PPI) como forma de avaliar a ação de antipsicóticos em larvas de zebrafish (BURGESS; GRANATO, 2007). Sabe-se que pacientes esquizofrênicos apresentam um déficit nesse comportamento, o que torna esse fenótipo um importante alvo de estudo. As larvas de zebrafish (6 dpf) apresentaram PPI similar ao encontrado em humanos, sendo que agonistas dopaminérgicos, como apomorfina, afetaram esse comportamento. De forma interessante, o tratamento de larvas com haloperidol foi suficiente para reverter o PPI induzido com agonistas dopaminérgicos, o que ocorre de forma similar em mamíferos. Isso indica que existem mecanismos conservados que regulam o PPI entre mamíferos e larvas de zebrafish.

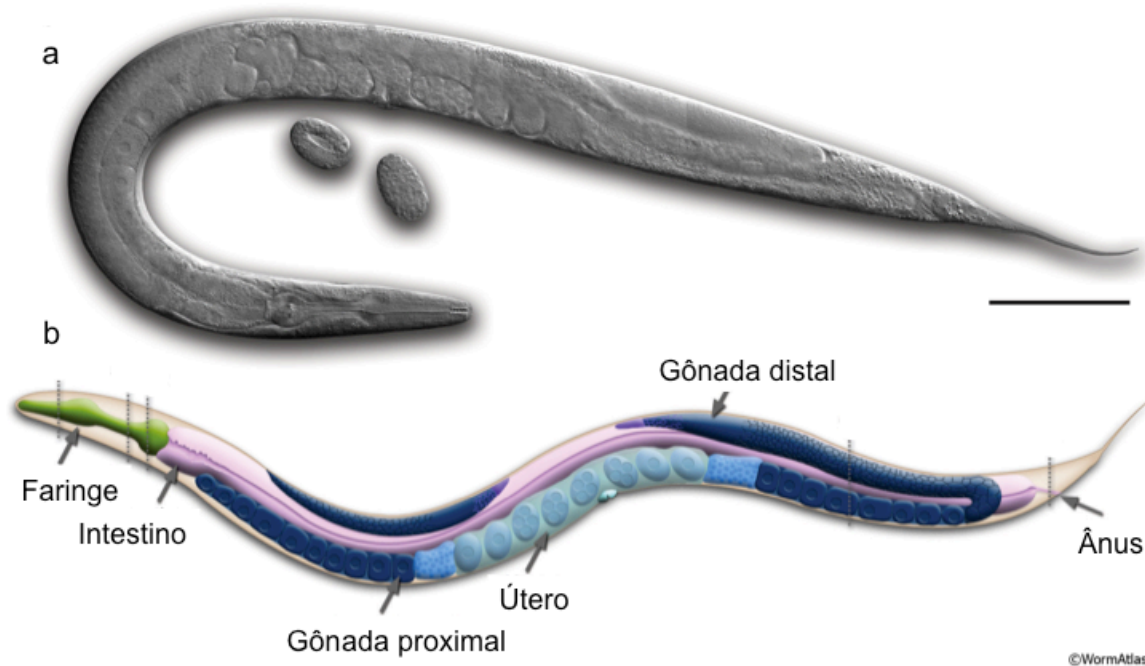
Além desses estudos, foi demonstrado que a clozapina foi capaz de reduzir a distância percorrida por larvas de zebrafish com 7 dpf, o que parece ser mediado parcialmente pelo antagonismo do receptor dopaminérgico  $D_4$ , mas não por  $D_2$  (BOEHMLER et al., 2007). Os receptores dopaminérgicos parecem seguir papéis opostos no controle do comportamento motor da larva. O agonismo do receptor  $D_2$ , tanto por dopamina exógena quanto por agonista específico, é capaz de reduzir o número de episódios de movimento, o que também ocorreu com o antagonismo de  $D_1$  (SOUZA; ROMANO-SILVA; TROPEPE, 2011). Entretanto, neste estudo, o tratamento com agonista específico de receptor  $D_1$  foi capaz de aumentar o número de episódios. Esses resultados demonstram que os distintos receptores dopaminérgicos exercem papéis bastante diferentes no controle da atividade locomotora de larvas de zebrafish.

Portanto, o uso da larva de zebrafish como ferramenta no estudo farmacológico apresenta um grande potencial. O aprimoramento dos modelos existentes e o

desenvolvimento de novos torna-se crucial para o melhor aproveitamento do zebrafish como modelo experimental alternativo.

#### 1.4 *Caenorhabditis elegans*

O *C. elegans* (Figura 9) é um nematódeo não parasita que vive em solos úmidos de regiões com clima ameno. É um modelo animal amplamente utilizado por ter um ciclo de vida curto (do ovo a adulto em 3.5 dias) e de fácil cultivo, ser facilmente manipulado geneticamente (permite a produção de mutantes e transgênicos) e por ter tamanho reduzido (adultos medem 1 mm de comprimento). Alimentam-se primariamente de bactérias, podendo ser cultivados tanto em meio líquido como em meio sólido (p. ex., placas de ágar).



**Figura 9.** Anatomia de um hermafrodita adulto de *C. elegans*. **a** – Imagem do lado esquerdo de um adulto hermafrodita captada por microscopia de interferência diferencial. Escala da barra: 0.1 mm. **b** – Desenho esquemático das estruturas anatômicas da lateral esquerda. Adaptado do WormAtlas. Adaptado (ALTUN; HALL, 2009).

Apresentam dois sexos: hermafroditas que se autofecundam e machos. Após os estágios larvais (L1 – L4), os hermafroditas apresentam 959 células somáticas (ALTUN; HALL, 2009). Dentre estas, 302 são neurônios organizados em gânglios na cabeça e cauda, indicando a importância do sistema nervoso na vida evolutiva do verme. Apesar do pequeno número de neurônios, o animal apresenta comportamentos simples (locomoção, alimentação e defecação) e comportamentos complexos como atração e repulsão por diferentes químicos, modulação do comportamento pela comida e comportamento sexual (DE BONO; MARICQ, 2005). A partir de diferentes neurônios sensoriais que detectam sinais tão diferentes como níveis de oxigênio, textura de bactérias e calor, o nematódeo consegue integrar e desenvolver resposta comportamental apropriada ao estímulo. O *C. elegans* utiliza muitos dos neurotransmissores encontrados em vertebrados como GABA, glutamato, acetilcolina, serotonina e dopamina. Essas características fazem do nematódeo um excelente modelo para avaliar mecanismos de ação de fármacos neuropsiquiátricos.

Várias cepas de *C. elegans* coletadas em diferentes partes do mundo apresentam variações fenotípicas de comportamento. Por exemplo, os nematódeos da cepa padrão N2, quando em contato com bactérias (fonte de alimento), reduzem a atividade locomotora e ficam dispersos para se alimentarem de forma solitária. Ao contrário, cepas sociais, tal como AB3, não reduzem a atividade locomotora em resposta à presença de bactérias e se agregam em grupos contendo vários indivíduos, acumulando-se onde a camada de bactérias é mais espessa. Essa variação comportamental é determinada por uma mutação no gene NPR-1, homólogo do receptor de neuropeptídeo Y (NPY) encontrado em mamíferos (DE BONO; BARGMANN, 1998). A mutação torna o receptor NPR-1 menos ativo, o que impede que o receptor reprima o comportamento social de maneira adequada.

Embora o NPR-1 seja homólogo do receptor de NPY, não há homólogos do peptídeo NPY ligante em *C. elegans*. Entretanto, foi demonstrado que dois



peptídeos do tipo FMRFamida chamados FLP-21 e FLP-18 são capazes de ativar o NPR-1 selvagem. Entretanto, apenas o FLP-21 é capaz de ativar o NPR-1 mutante encontrado nas cepas sociais e mesmo assim com menor eficiência (ROGERS et al., 2003). O NPR-1 modula o comportamento social ao agir em vários circuitos neurais. Primeiramente, o NPR-1 expresso em neurônios expostos na cavidade corporal do verme são necessários para reprimir o comportamento social (COATES; DE BONO, 2002). Segundo, a mutação do NPR-1 promove comportamento de agregação e acúmulo de vermes onde a bactéria está mais espessa apenas quando os níveis de oxigênio estão elevados, indicando que o NPR-1 mutante promove a repulsão por oxigênio (GRAY et al., 2004). Terceiro, o comportamento social depende de neurônios nociceptivos que sinalizam através de quimiorreceptores. Esses neurônios aparentemente detectam sinais repulsivos produzidos pelas bactérias induzindo a agregação (DE BONO et al., 2002).

O comportamento social das cepas mutantes demonstra como um organismo portando um sistema nervoso compacto pode desenvolver comportamentos complexos. Essas cepas já foram utilizadas em outro estudo para avaliar os efeitos do etanol, no qual foi demonstrado que a mutação de NPR-1 altera a resposta comportamental em resposta ao tratamento com o solvente (DAVIES et al., 2004). O comportamento singular das cepas sociais de *C. elegans* apresenta como modelo potencial para estudar os efeitos farmacológicos de antipsicóticos. Dessa forma, o comportamento das cepas sociais se apresenta como um modelo experimental viável para estudar a ação de antipsicóticos nos mecanismos alimentares e de interação social do nematódeo *C. elegans*.

## **2 Objetivo**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver novos métodos para avaliar os efeitos comportamentais e metabólicos de antipsicóticos utilizando modelos alternativos.

### **2.2 Objetivos específicos**

#### **2.2.1 Modelo utilizando larvas de zebrafish**

- Avaliar *in vivo* os efeitos metabólicos adversos induzidos por antipsicóticos e dopamina na absorção do vitelo de larvas de zebrafish utilizando sonda lipofílica Nile Red;
- Avaliar o efeito de antipsicóticos na agregação e dispersão de melanossomos em melanóforos de larvas de zebrafish;
- Desenvolver método para avaliar o efeito de antipsicóticos no comportamento de flotação de larvas de zebrafish;
- Avaliar por quais mecanismos os antipsicóticos atípicos clozapina e risperidona induzem comportamento de flotação através do uso de ferramentas farmacológicas;
- Avaliar os efeitos de antipsicóticos na atividade locomotora espontânea em larvas de zebrafish.

#### **2.2.2 Modelo utilizando vermes nematódeos adultos de *C. elegans***

- Avaliar o efeito do antipsicótico atípico clozapina no comportamento social de agregação de cepas sociais.

### 3 Materiais e métodos

#### 3.1 Cuidados gerais: zebrafish

Os métodos de cuidado com zebrafish foram baseados e adaptados de duas fontes: “The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish” (WESTERFIELD, 2000) e “Zebrafish: practical approach” (NUSSLEIN-VOLHARD; DAHM, 2002). O biotério para criação e manutenção localiza-se em duas salas situadas no Núcleo de Experimentação Animal, setor vinculado ao Centro de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Os procedimentos experimentais e de manejo foram aprovados previamente pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG) sob o protocolo n°. 9 / 2012. As subseções que se seguem são os detalhamentos das adaptações feitas no nosso biotério.

##### 3.1.1 Sistema de aquários

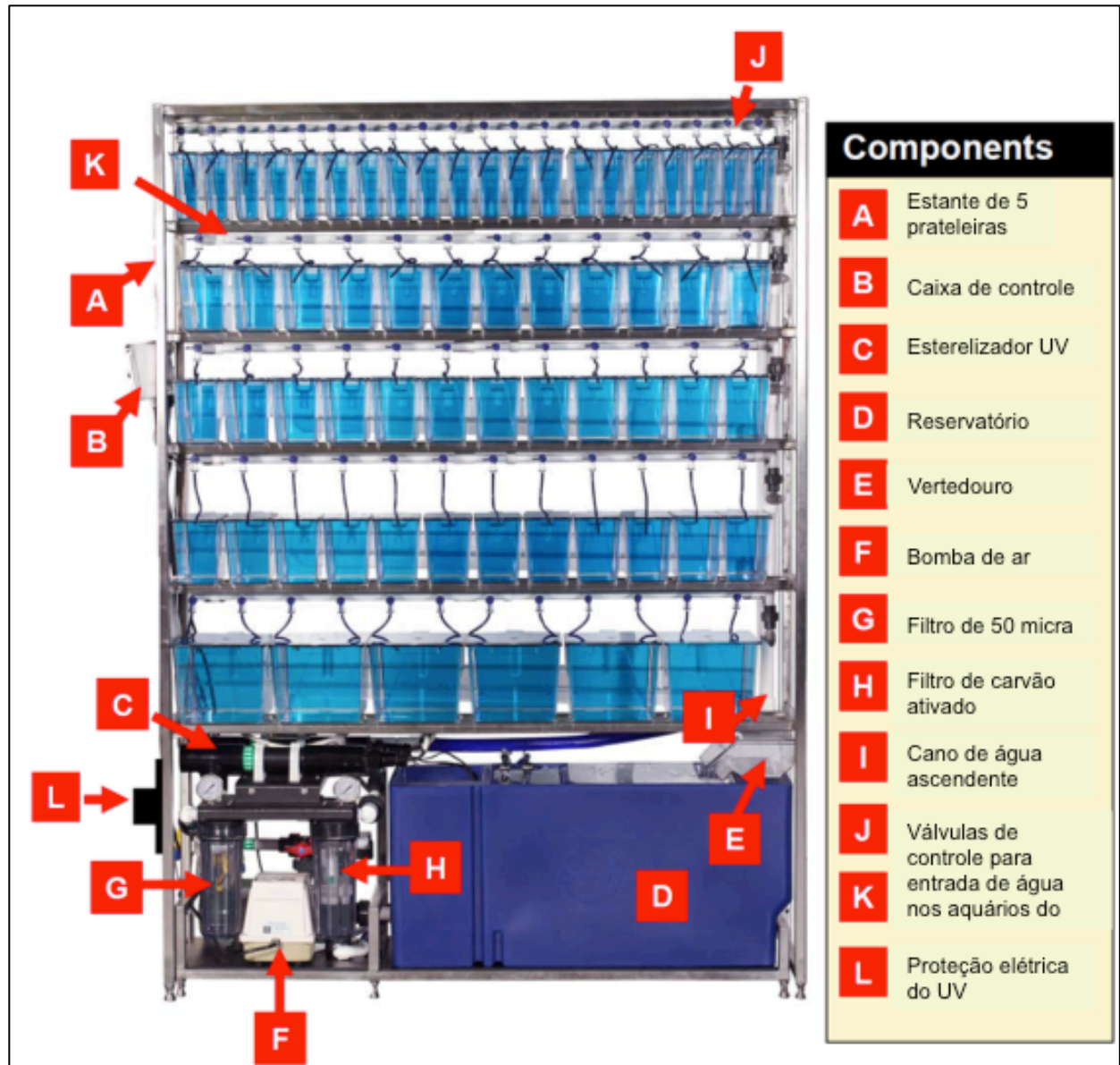
Os peixes foram mantidos em um sistema de recirculação de água, modelo Zebrafish Stand-Alone ZF0601 (Aquatic Habitats, Estados Unidos) (Figura 10). Neste sistema, a água recircula 24 horas/dia sendo tratada por vários meios afim de manter a qualidade ideal para o desenvolvimento dos peixes. Primeiramente, a água que é drenada dos aquários, passa por um filtro de partículas grandes, onde removem-se fezes e comida não utilizada. Após esta etapa, a água passa por um filtro biológico que é composto de peças plásticas contendo bactérias nitrificadoras que metabolizam os compostos tóxicos amônia e nitrito, em nitrato, um composto mais tolerado pelos peixes. Além disso, a água é aerada utilizando uma bomba de ar visto que a espécie *Danio rerio* necessita de água saturada de oxigênio. Após isso, a água passa pelo filtro de partículas e de carvão ativado

com o intuito de remover partículas maiores que 50 micrômetros e outros compostos tóxicos.

Antes de a água retornar aos aquários, esta é esterilizada por duas lâmpadas de emissão ultravioleta. Cada aquário possui um sistema de mangueiras pelo qual se controla o fluxo de água. Nesse sistema, a água do aquário é trocada constantemente, sendo drenada para o sistema de tratamento da água onde ocorrerá o processo novamente. Além disso, diariamente, 10% de água que recircula do sistema é descartada manualmente evitando o acúmulo de compostos tóxicos.

A água descartada é então substituída por água limpa que foi previamente filtrada em sistema de filtros (nesta ordem, filtro de partícula 50 micra, filtro de 5 micra, filtro de carvão ativado) e aerada em barriletes (Figura 11). Essa pré-filtragem é necessária para remover cloro ativo (tóxico aos peixes) e outros componentes tóxicos, tal como pesticidas. Antes de entrar no sistema, o pH da água é corrigido para 7.2-7.4 (avaliado por Phmetro de bancada Hanna pH 21), utilizando bicarbonato de sódio e a condutividade é corrigida com cloreto de cálcio (avaliada por condutímetro de mão – Combo pH & EC Hanna).

A sala é mantida em temperatura de 26 - 27°C e a água entre 27 – 28,5°C. O ciclo de luz é controlado automaticamente por um interruptor horário (Coel – modelo RTST-20) com ciclo diário de 14 horas de luz e 10 horas de escuro, simulando uma atmosfera primavera/verão tropical. O ambiente apresenta luminosidade de aproximadamente 500 lux. O uso desse sistema reduz o estresse de peixes, pois todos os parâmetros são diariamente controlados (Tabela 9), evitando oscilações bruscas. Além disso, são essas condições que permitem que os peixes se reproduzam continuamente ao longo do ano.



**Figura 10.** Foto ilustrativa do sistema Zebrafish Stand-Alone ZF0601 - Aquatic Habitats, Estados Unidos, destacando seus componentes. (Adaptado do manual Aquatic Habitats, segunda edição).



**Figura 11.** Sistema de pré-filtros e tratamento da água em barriletes.

**Tabela 9:** Condições ambientais e físico-químicas do sistema de aquários.

<b>Parâmetro</b>	<b>Recomendado</b>
Densidade de peixes para manutenção	Até 10 peixes/Litro
Densidade de peixes para reprodução	Até 6 peixes/Litro
Fluxo de água por tanque	Tanque de 10L: 60L/h; Tanque 3L: 18L/h
Iluminação	Ciclo 14h claro:10h Escuro; 100-300 lux
Temperatura água	26-28.5°C (22-30°C tolerado)

pH	6.8 - 7.5 (6.0-8.5 tolerado)
Alcalinidade da água	~50-100 mg/L CaCO <sub>3</sub>
Dureza da água	~50-100 mg/L CaCO <sub>3</sub>
Amônia não-ionizada (NH <sub>3</sub> )	< 0.02 mg/L
Nitrito	< 0.1 mg/L
Nitrato	< 5-10 mg/L
Oxigênio dissolvido	6.0 mg/L - saturado
Condutividade	200-1000 µS

### 3.1.2 Origem das matrizes de *Danio rerio*

As matrizes dos peixes do tipo selvagem da espécie *Danio rerio* tiveram origem de uma piscicultura localizada na zona rural do município de Muriaé/MG. Foram adquiridos, no ano de 2010, aproximadamente 400 peixes adultos, sendo 200 machos e 200 fêmeas. Os peixes foram então implantados no sistema de recirculação onde foram realizados cruzamentos para manter o estoque de matrizes.

### 3.1.3 Reprodução

Todas as larvas utilizadas no experimento foram obtidas no biotério. Após a alimentação no final do período vespertino, uma fêmea e dois machos foram transferidos através de rede de coleta para um tanque de reprodução (volume um litro). O tanque de reprodução contém um fundo falso com gretas por onde os ovos fertilizados (embriões) conseguem atravessar e se depositar no fundo. Esse fundo falso serve como proteção dos ovos para evitar a predação dos mesmos pelos peixes adultos. Os peixes são mantidos no aquário de reprodução até a manhã seguinte, período no qual aumenta a probabilidade de reprodução. Os embriões são coletados vertendo a água do aquário de reprodução sobre um coador de plástico. Os ovos retidos no coador são lavados com jato de água do sistema através do uso de pisseta, removendo assim fezes aderidas ao córion dos embriões. Estes são transferidos para placas de Petri

(100 mm – 25 mL) na densidade máxima de 80 embriões/placa contendo meio de embrião E2 (15 mM NaCl, 0.5 mM KCl, 0.49 mM MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.042 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> e 0.07 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.2). O meio de embrião é extremamente importante devido aos seguintes fatores: reduzir o crescimento bacteriano; fornecer os minerais necessários para o desenvolvimento dos embriões; e manter o meio tamponado.

### **3.1.4 Crescimento dos embriões**

Os embriões são mantidos em incubadora (estufa mini-incubadora microprocessada para B.O.D – QUIMIS - Modelo Q315M13) a 28°C com ciclo de luz 14:10h claro-escuro controlado por interruptor horário (Figura 12). Cada placa de Petri fica sobre um papel cartão de cor verde de forma a evitar a ausência de fundo devido ao suporte gradeado da incubadora. O meio dos embriões é trocado diariamente por meio fresco, removendo embriões não viáveis, restos de córions eclodidos e outros detritos. Nesse processo, embriões e larvas até 7 dias pós-fertilização (dpf) não precisam de alimento pois se nutrem de vitelo endógeno do saco vitelínico. Para manutenção do estoque de peixes adultos, larvas de 5 dpf foram transferidas para o sistema e cuidadas até virarem adultos (ver adiante). Nos experimentos, foram sempre utilizados sempre embriões obtidos da mesma fêmea para reduzir a variabilidade causada pela qualidade do vitelo materno e genética dos parentais.





**Figura 12.** Incubadora (estufa mini-incubadora microprocessada para B.O.D – QUIMIS - Modelo Q315M13). Embriões e larvas foram incubados em temperatura controlada (28°C) com ciclo de luz de 14-10h.

### 3.1.5 Alimentação

As diferentes fases larvais e os adultos diferem nos requerimentos nutricionais. Portanto, diferentes dietas são oferecidas ao longo da vida do zebrafish. Abaixo, a descrição da dieta e forma de administração:

- Larvas (a partir do 5 dpf ao 11 dpf): ração Sera Micron desenvolvida para larvas recém eclodidas (Sera, Alemanha). Ração foi oferecida duas vezes ao dia, uma vez no período matutino e outra no período vespertino.
- Larvas (11 dpf até 30 dpf): Sera Vipan Baby (Sera, Alemanha) oferecida duas vezes ao dia, uma vez no período matutino e outra no período vespertino.

- Peixes juvenis a adultos (a partir de 30 dpf): necessitam de ração com alto conteúdo proteico e de artêmia salina para induzir a produção ovos pelas fêmeas. Foi utilizada a ração TetraMin Tropical Flakes (Tetra, Alemanha). Antes de ser incluída na dieta dos peixes, os flocos da ração tiveram o seu tamanho reduzido utilizando graal e pistilo. A redução do tamanho dos flocos permite maior eficiência na ingestão da ração. A ração é oferecida duas vezes ao dia, uma vez no período matutino (8 – 10h) e uma vez no período vespertino (16 – 18h). A cada aquário, adicionou-se ração suficiente para que os peixes comessem por completo num período de até 5 minutos. Nauplii (larvas de artêmia salina, logo após a eclosão dos cistos) foram oferecidas logo em seguida da ração no volume de 1 mL para aquários de 3 litros e de 2 mL para aquários de 10 litros.

### **3.1.6 Eutanásia dos animais**

O protocolo de eutanásia segue a recomendação da literatura (WILSON; BUNTE; CARTY, 2009). Para a eutanásia tanto peixes adultos quanto larvas foram transferidos para recipiente contendo água do sistema que foi resfriada com gelo triturado a uma temperatura de 2 a 4°C. Os peixes e larvas permaneceram na água gelada por no mínimo 10 minutos. Os peixes mortos foram congelados e descartados apropriadamente.

### **3.1.7 Doenças**

Os procedimentos quanto ao controle de doenças foram adaptados da literatura (MATTHEWS, 2004). Qualquer peixe adulto ou larva com sintomas de doença foram eutanasiados ou isolados em aquário externo (quarentena) do sistema. Peixes doentes apresentam sinais claros como cauda e espinha encurvada, apatia, mudança na coloração das guelras e olhos, escamas levantadas, entre outros parâmetros.

### 3.2 Fármacos: Zebrafish

Os fármacos utilizados nos experimentos envolvendo zebrafish estão descritos na tabela 10 juntamente com as informações sobre veículo, concentração do estoque e concentrações finais utilizadas nos experimentos. Todos os fármacos foram administrados por diluição no meio no qual se encontravam as larvas (meio E2). A concentração máxima final do veículo DMSO foi de 0.3%, o que não leva a toxicidade das larvas. As concentrações foram determinadas a partir de padronizações e também de dados da literatura (RIHEL et al., 2010).

**Tabela 10.** Fármacos utilizados nos experimentos com larvas de zebrafish.

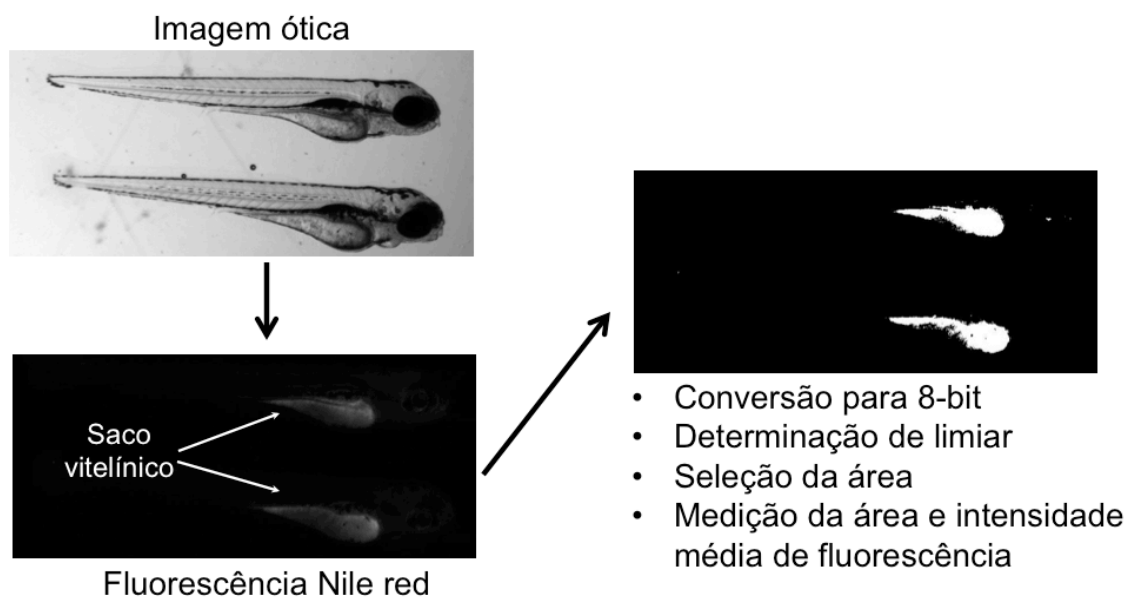
Fármacos	Companhia	Concentração estoque/ Veículo	Concentrações finais
Dopamina	- Sigma-Aldrich	- 50 mM/ Água	12.5-100 $\mu$ M
Clozapina	- Sigma-Aldrich - TRC	- 15 mM/ DMSO - 12 mM/ DMSO	0.5-40 $\mu$ M
Risperidona	- TRC	- 8 mM/ DMSO	1-20 $\mu$ M
Olanzapina	- Santa Cruz	- 25 mM/ DMSO	12.5-100 $\mu$ M
Haloperidol	- Sigma-Aldrich	- 15 mM/ DMSO	0.3-20 $\mu$ M
Bupropiona	- TRC	- 50 mM/ Água	3-100 $\mu$ M/
Mepiramina	- Sigma-Aldrich	- 8 mM/ Água	1-100 $\mu$ M/
Ketanserina	- TRC	- 5 mM/ DMSO	5-20 $\mu$ M
Yohimbina	- Sigma-Aldrich	- 12 mM/ DMSO	1-10 $\mu$ M

### 3.3 Tratamento farmacológico e marcação *in vivo* de lipídeos em larvas de zebrafish

Larvas de zebrafish de 2 dpf foram utilizadas no experimento. As larvas foram decorionadas (remoção do córion utilizando pinças metálicas) e transferidas para placas de 24 poços utilizando meio E2. Dez larvas foram transferidas para

cada poço, o meio foi totalmente removido e 500 µL de solução de fármaco em meio E2 foram adicionados. Foi realizada curva de concentração resposta para dopamina, haloperidol, clozapina (Sigma-Aldrich) e olanzapina (Santa Cruz Biotechnology). Todos os fármacos tiveram como veículo DMSO (EMSCIENCE), exceto a dopamina que teve água como veículo. As larvas foram tratadas por dois dias até a idade de 4 dpf, trocando o meio com solução fresca de fármaco no final do primeiro dia. As larvas foram incubadas a uma temperatura de 28 °C ao longo de todo experimento. Um dia antes da imagem, foi adicionado Nile Red (Invitrogen) na concentração final de 200 ng/mL (estoque 100 µg/mL em acetona). Nile red é um corante lipofílico que apresenta fluorescência em meios hidrofóbicos (excitação máxima de 510 nm e emissão máxima de 585 nm quando diluído em triglicerídeos) (GREENSPAN; MAYER; FOWLER, 1985). As larvas de 4 dpf tratadas e marcadas com Nile Red foram anestesiadas com tricafina metanosulfato (Sigma-Aldrich) e montadas em lâminas de microscópio utilizando gel de metilcelulose (3% em meio E2). O gel de metilcelulose foi utilizado sempre em temperaturas baixas (2 - 4°C) para aumentar a viscosidade e permitir que as larvas ficassem na posição correta. Quatro larvas foram fotografadas ao mesmo tempo para reduzir o tempo de manipulação. As larvas foram avaliadas em estereomicroscópio de fluorescência (Leica MZFLIII) utilizando filtros de emissão vermelhos. As imagens foram adquiridas usando câmera CCD monocromática (Spot Diagnostics Instruments 1.4 mb), utilizando o mesmo tempo de exposição em todas aquisições. Foram adquiridas duas imagens das larvas: imagem ótica para análise morfológica e a imagem da fluorescência para visualizar a marcação com Nile Red. A imagem fluorescente foi processada utilizando o software ImageJ 1.46q para plataforma Mac OS X (Figura 13). As imagens foram transformadas em 8-bit e estipulado um 'threshold' no qual apenas o saco vitelínico ficasse demarcado pela fluorescência. Com a ferramenta 'wand tool', foi selecionado apenas o saco vitelínico e avaliado os seguintes parâmetros: área (soma do quadrado dos pixels dentro da área demarcada) e intensidade média de fluorescência (soma dos valores de cinza para cada pixel sobre o número de pixel na área

demarcada). Um índice foi desenvolvido para incluir a informação da área e da intensidade de fluorescência (área x intensidade média de fluorescência). Dois experimentos foram realizados utilizando larvas de parentais distintos. Cada experimento foi normalizado em porcentagem pela média do seu respectivo controle para que número amostral de ambos os experimentos pudessem ser combinados. Valores amostrais que apresentaram valor entre 0 e 1 % foram eliminados como *outliers*.

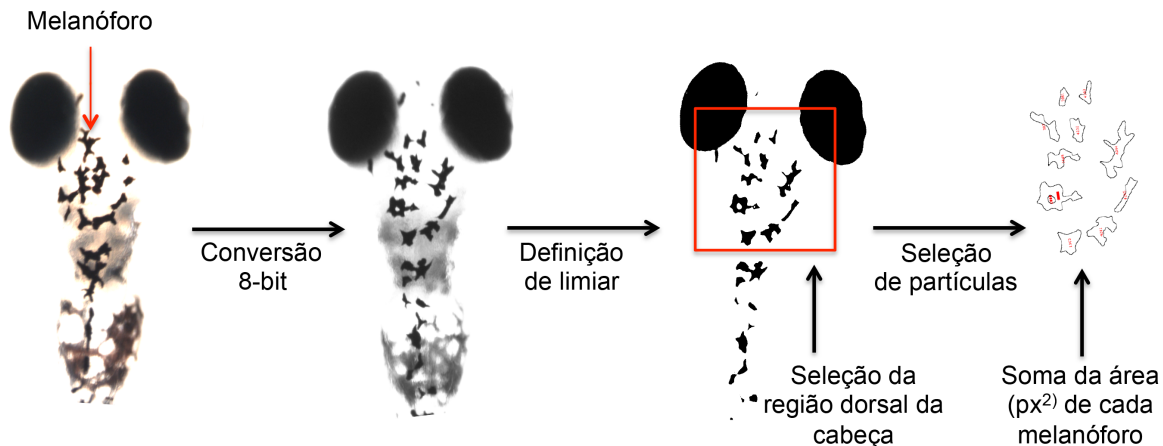


**Figura 13.** Processamento de imagem de larvas marcadas com sonda lipofílica fluorescente Nile Red. Utilizando estereomicroscópio, foram adquiridas duas imagens das mesmas larvas: imagem ótica e de fluorescência. A imagem ótica permite verificar se a larva apresenta algum sinal de toxicidade (edema, torção do corpo, comprimento). A imagem fluorescente permite determinar o conteúdo lipídico do saco vitelínico. A imagem fluorescente é transformada em 8-bit e determina-se um limiar de fluorescência. A região ressaltada pelo limiar é selecionada e analisada pelo programa ImageJ 1.46q determinando o a área e a intensidade média de fluorescência da área selecionada.

### 3.4 Teste de dispersão e contração de melanóforos

Para obter melanóforos respondíveis às mudanças de iluminação ambiente, as placas de Petri contendo os embriões foram incubadas sobre um fundo verde

(papel cartão verde) durante todo o período de desenvolvimento (até 7 dpf). As larvas de 7 dpf foram transferidas por meio de pipetas plásticas para placa de 24 poços com 15 larvas por poço. O meio E2 foi inteiramente removido e solução de fármaco em meio E2 foi adicionada a cada poço na concentração final. A placa foi incubada por um período de 30 minutos no escuro (placa envolvida por papel alumínio) a 28°C para permitir que as vesículas dos melanóforos dispersassem. Após esse período, as placas tiveram o papel alumínio removido juntamente com as tampas, e as larvas foram expostas a um ambiente com plano de fundo branco com incidência direta de luz fluorescente por uma hora a 28°C. Esse período permite que as vesículas dos melanóforos possam se agregar, avaliando a interferência do fármaco nesse processo. Após a exposição à luz, as larvas foram transferidas com pipetas plásticas para tubos cônicos de 1.5 mL e esses foram incubados diretamente no gelo. Esta etapa é importante para impedir a dispersão/ agregação dos melanossomos. O líquido foi inteiramente removido utilizando pipetas e foi adicionado 0.5 mL de formalina 4% tamponada em PBS, pH 7.4. As larvas foram fixadas por 24 horas e então fotografadas utilizando câmera DS-Fi1 acoplada ao estereomicroscópio Nikon SMZ 1500. Para realizar a imagem, as larvas foram dispostas em lâminas de microscópio contendo meio viscoso de metilcelulose 4% para posicionar as larvas de forma a tornar a parte dorsal da cabeça completamente visível. Foram fotografadas duas larvas por vez, dispostas de forma paralela. A imagem da cabeça das larvas foi processada utilizando o software ImageJ 1.46q para plataforma Mac OS X (Figura 14). As imagens foram transformadas em 8 bit e estipulado um limiar no qual apenas os melanóforos ficassem demarcados. Foi feita uma demarcação da região da cabeça e os melanóforos foram selecionados pela ferramenta “seleção de partículas”. Após verificar que apenas os melanóforos foram selecionados pela ferramenta, foi determinada a soma da área dos melanóforos (pixel<sup>2</sup>).



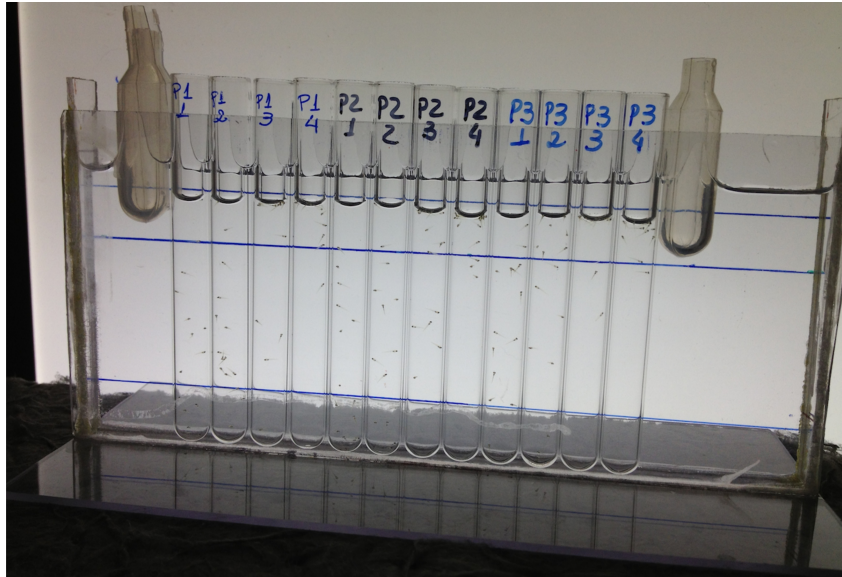
**Figura 14.** Processamento de imagem de melanóforos. O programa ImageJ 1.46q foi utilizado no processamento. O fluxo procede da esquerda para direita. Primeiramente, a imagem ótica da região dorsal da larva foi adquirida utilizando estereomicroscópio. A seta vermelha indica um melanóforo. A imagem em cor foi convertida para 8-bit para então ser definido um limiar (“threshold”) que seleciona os melanóforos. A região dorsal da cabeça foi selecionada utilizando caixa de seleção do programa. Dentro da região selecionada, utilizou-se ferramenta de seleção de partículas. As partículas selecionadas (ampliadas na figura para melhorar a visualização) correspondem à área ( $\text{pixel}^2$ ) total dos melanóforos.

### 3.5 Teste comportamental de flotação de larvas de zebrafish

Larvas de 7 dpf foram utilizadas no experimento. Para realizar o comportamento, foram utilizados tubos de ensaio de vidro (altura 10 cm, diâmetro 1 cm; volume de trabalho 4 mL) que ficam imersos em água em uma estrutura de acrílico. O intuito da água na parte externa do tubo é de evitar a refração da luz (9 cm x 20 cm x 1.5 cm, altura x comprimento x largura) (Figura 15). Para avaliar a atividade basal de flotação, 15 larvas foram transferidas para cada tubo, num volume final de 4 mL de meio E2. As larvas foram transferidas para caixa de comportamento (madeira compensada, 28 cm x 78 cm x 37 cm) (Figura 16) e ali permaneceram sem serem estimuladas por 15 minutos. A caixa de comportamento apresenta uma fonte de luz fluorescente (negatoscópio) que se localiza atrás dos tubos, além de uma câmera filmadora digital (Sony Handycam HDR-CX130). Após 15 minutos, a função gravar da câmera foi iniciada manualmente e a porta da caixa

fechada. O comportamento das larvas foi gravado por um período de 7 minutos. Após o período de avaliação do comportamento basal de flotação, o recipiente contendo os tubos foi removido da caixa de comportamento. Então, com cuidado para não pipetar nenhuma larva, foram removidos 2 mL de meio E2 de cada tubo de ensaio utilizando micropipeta. A cada tubo foram adicionados 2 mL de solução de fármaco (2x concentrado), atingindo um volume final de 4 mL. Quando necessário, o veículo DMSO foi adicionado em todos os pontos da curva de concentração, incluindo o grupo controle. As larvas foram expostas ao fármaco por 30 minutos. Antes de iniciar a filmagem, os tubos foram transferidos para a mesma caixa de comportamento e neste lugar permaneceram por 15 minutos antes da filmagem. A função gravar da câmera foi iniciada manualmente e a porta da caixa fechada. O comportamento das larvas foi gravado por um período de 7 minutos. O teste de atividade locomotora foi avaliado no período entre 11:00 e 17:00. Após a gravação, o vídeo (formato .mts) foi transferido para computador. A análise do comportamento de flotação foi feita manualmente. A coluna d'água foi dividida em cinco partes iguais, delimitando (por meio de uma linha traçada no recipiente) 1/5 da parte superior e 1/5 da parte inferior dos tubos (Figura 17). O número de larvas na parte superior e inferior de cada tubo foi avaliado nos seguintes minutos da gravação: 2:45, 3:15, 3:45, 4:15, 4:45. Apenas larvas com o corpo inteiro em cada região foram consideradas. Após a contagem, foi feita uma média aritmética do número de larvas nos tempos avaliados. Então, um índice foi desenvolvido para estabelecer o comportamento de flotação: a média do número de larvas (na parte superior ou inferior do tubo) no tratamento foi dividida pela média de larvas (na parte superior ou inferior do tubo) no estado basal (média superfície tratamento/média superfície basal; média fundo tratamento/ média fundo basal). Assim, o índice reflete quantas vezes o fármaco aumentou ou reduziu a flotação.



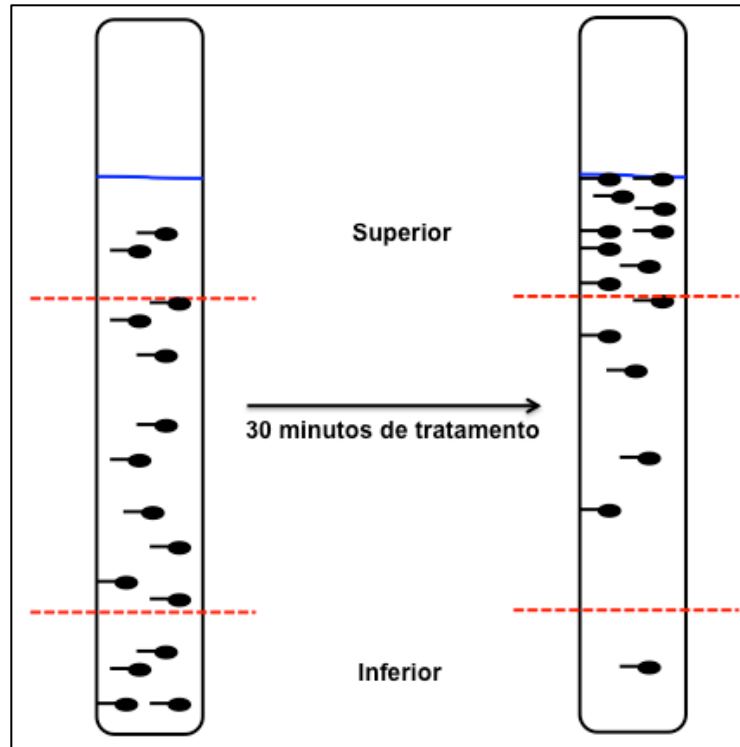


**Figura 15.** Estrutura de acrílico utilizada no experimento de flotação. A estrutura (9 cm x 20 cm x 1.5 cm) atua como apoio para os tubos de ensaio contendo as larvas ao mesmo tempo que os tubos ficam envoltos em água, o que evita difração da luz na hora da filmagem.



**Figura 16.** Caixa de comportamento de flotação (madeira compensada; 28 cm x 78 cm x 37 cm). Na foto, pode-se observar o negatoscópico como fonte de iluminação e a câmera filmadora fixada.

A estrutura de acrílico se localiza entre a câmera e a fonte de iluminação, permitindo melhor contraste das larvas. A caixa possui uma tampa de madeira que isola completamente o interior da caixa momento da filmagem.

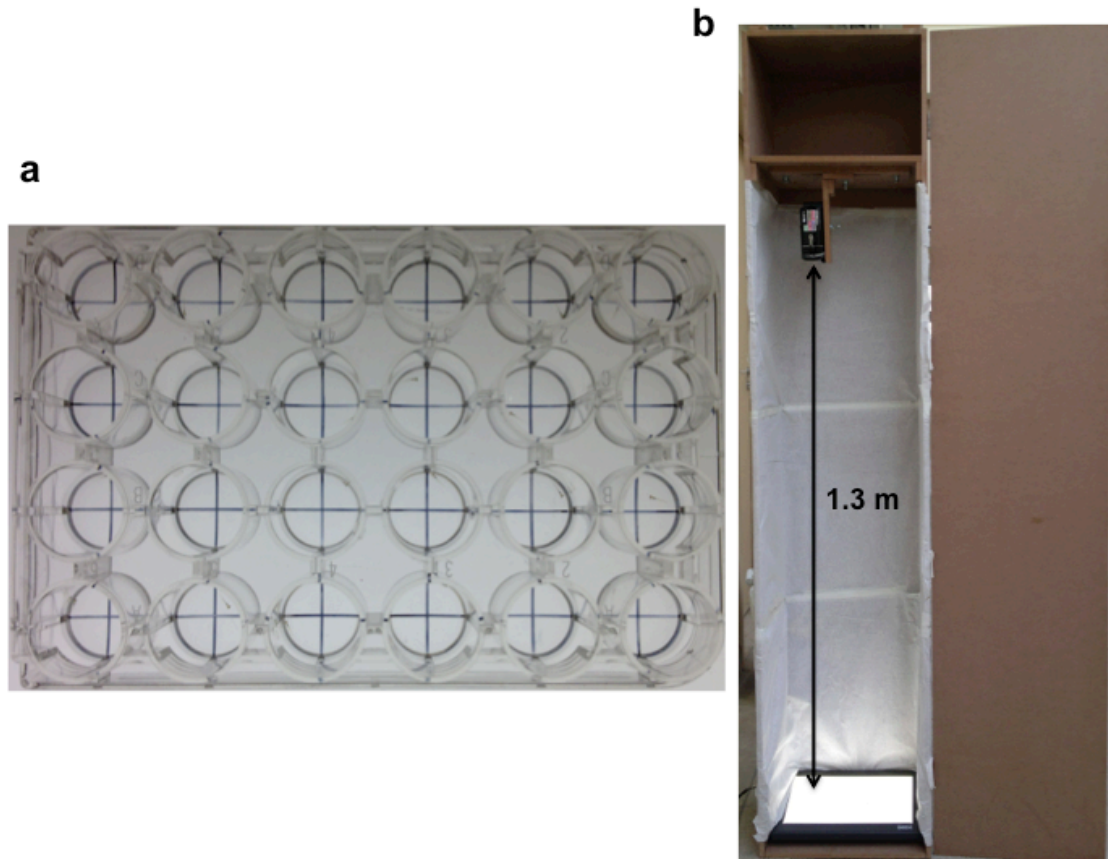


**Figura 17.** Desenho experimental de avaliação do comportamento de flotação. A coluna de água do tubo de ensaio foi dividida de tal forma que foram estabelecidas uma região superior (superfície) e uma região inferior (fundo), sendo que cada região equivale a 1/5 do altura da coluna. O número de larvas em cada região foi avaliado tanto antes (basal) como 30 minutos após o tratamento nos seguintes minutos da gravação: 2:45, 3:15, 3:45, 4:15, 4:45. Apenas larvas com o corpo inteiro em cada região foram consideradas. Após a contagem, foi feita uma média aritmética do número de larvas nos tempos avaliados. O índice de flotação foi definido pela média do número de larvas em cada região no tratamento, dividida pela média de larvas no estado basal (média superfície tratamento/média superfície basal; média fundo tratamento/média fundo basal)

### 3.6 Teste de atividade locomotora espontânea de larvas de zebrafish

Larvas de 7 dpf foram utilizadas no experimento. Placas plásticas de 24 poços (Sarstedt) foram utilizadas para avaliar a atividade locomotora de larvas de zebrafish. Previamente, foram delimitadas na parte externa de cada poço, quatro

áreas idênticas utilizando caneta preta permanente (Figura 18a). Apenas uma larva de zebrafish com 7 dpf foi transferida para cada poço por meio de pipeta plástica de transferência. O meio foi completamente removido e então adicionado 300  $\mu$ L de meio E2 fresco para cada poço. Um volume de 300  $\mu$ L de solução contendo fármaco (solução 2x concentrada) diluído em meio E2 foi adicionado em cada poço, atingindo um volume final de 600  $\mu$ L. Quando necessário, o veículo DMSO foi adicionado em todos os grupos, incluindo o grupo controle. As larvas foram expostas a cada fármaco por 30 minutos. No mínimo, 24 larvas foram utilizadas para cada tratamento. Antes de iniciar a filmagem, a placa contendo as larvas foi transferida para um caixa desenvolvida para a gravação do comportamento (madeira compensada; 1,81 m x 37 cm x 29 cm) (Figura 18b) e neste lugar permaneceu por 15 minutos antes da filmagem. Nessa caixa, a placa foi disposta sobre uma fonte de luz fluorescente (negatoscópio), iluminando completamente o fundo da placa. Uma câmera filmadora digital (Sony Handycam HDR-CX1300) foi disposta 1.3 m acima da placa e foi utilizada a função teleobjetiva ('zoom') para enquadrar a placa no campo de captação da filmadora. Essa distância entre a filmadora e a placa foi necessária para reduzir a curvatura do campo visual causada pela lente, permitindo visualizar cada larva no fundo dos poços. Além disso, a única fonte de iluminação localiza-se no fundo da placa o que permite um maior contraste das larvas. Após 30 minutos de tratamento, a função gravar da câmera foi iniciada manualmente e a porta da caixa de comportamento fechada. A atividade locomotora espontânea foi gravada por um período de cinco minutos. Após a gravação, o vídeo (formato .mts) foi transferido para computador. A análise da atividade locomotora foi feita manualmente. O primeiro e último minuto foram descartados da análise, utilizando três minutos. Apenas um poço foi avaliado por vez contando-se o número de vezes que cada larva cruzou (quando a larva cruza todo corpo) as linhas demarcadas no fundo do poço. A análise foi feita utilizando contador manual. O teste de atividade locomotora foi avaliado no período entre 13:00 e 17:00.



**Figura 18.** Teste de atividade locomotora. a – Placa de 24 poços. Antes do experimento, foi delimitado na parte externa de cada poço quatro áreas idênticas utilizando caneta preta permanente. b – Caixa de teste de atividade locomotora. Na parte de baixo da foto, encontra-se um negatoscópio. Logo acima dele, repousa a placa contendo as larvas. A câmera foi posicionada 1.3 m acima da placa de forma fixa. A caixa encontra-se com a porta a aberta (direita).

### 3.7 Cuidados gerais: nematódeo *Caenorhabditis elegans*

Todos os procedimentos de manutenção seguiram as instruções do artigo “Maintenance of *C. elegans*” (STIERNAGLE, 2006). As cepas foram mantidas e cultivadas a 20°C em placas estéreis de ágar contendo meio de crescimento de nematódeo NGM (3 g/L NaCl; 17 g/L ágar; 2,5 g/L peptona; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; 5 mg/L colesterol; 1 mM MgSO<sub>4</sub>; 25 mM KPO<sub>4</sub>), usando a bactéria *Escherichia coli* OP50 como fonte de alimento. Os vermes *C. elegans* foram sincronizados da seguinte forma: vermes hermafroditas na fase adulta contendo ovos foram

coletados com água destilada estéril (10 mL) e transferidos para tubos cônicos de 15 mL. Os vermes foram concentrados por centrifugação (1000 x g, 1 min) e o sobrenadante descartado. Um volume de 5 mL de solução de lise contendo hidróxido de sódio e hipoclorito de sódio (3,75 mL H<sub>2</sub>O; 250 µL 10 N NaOH; 1 mL hipoclorito de sódio 2%) foi adicionada ao tubo e os vermes foram incubados por, no máximo, 5 minutos. A lise dos vermes foi monitorada utilizando estereomicroscópio para evitar a fragmentação excessiva dos nematódeos adultos. A reação foi interrompida ao adicionar 10 mL de tampão M9 (3 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 6 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 5 g/L NaCl; 1M MgSO<sub>4</sub>). Os ovos então foram lavados três vezes com tampão M9 (centrifugação 1000 x g, 1 min) e incubados no mesmo tampão 'overnight' para eclosão. No dia seguinte, aproximadamente 1200 vermes na fase L1 foram transferidos para placas de ágar NGM de 100 mm contendo camada de *E. coli* OP50 e incubados a 20°C até a fase adulta, três dias depois. Apenas adultos hermafroditas de desenvolvimento recentes foram utilizados.

### **3.8 Cepas de *C. elegans***

As cepas utilizadas foram obtidas do Caenorhabditis Genetics Centre (University of Minnesota, EUA), instituição que serve como repositório internacional de cepas de *C. elegans*. As seguintes cepas sociais selvagens foram utilizadas: AB3 e RC301/npr-1(g320). Estas cepas sociais possuem uma mutação no receptor NPR-1 no resíduo de aminoácido 215 com uma troca de uma valina por fenilalanina. A mutação reduz a atividade do receptor NPR-1 em relação ao ligante cognato FLP-21 e impede a ligação do ligante FLP-18 (de Bono & Bargmann, 1998).

### **3.9 Fármacos: *C. elegans***

Clozapina (TRC – Toronto, Canada) foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 30 mM e armazenada em alíquotas em freezer -20°C até o dia do experimento.

### **3.10 Preparação de placas ágar NGM para experimento de agregação e de atividade locomotora.**

Dois dias antes do experimento, 30 µL de meio LB (meio para bactérias) contendo concentrado de bactéria *E. coli* OP50 foram semeados em placas de ágar NGM de 35 mm (3 mL de solução de ágar) de modo a formar um inóculo de bactérias em forma de círculo. As bactérias foram incubadas a 20°C para crescer radialmente, formando um círculo de aproximadamente 10 mm de diâmetro com acúmulo de bactérias nas bordas.

### **3.11 Preparação de placas de ágar NGM com fármacos**

Concentrações finais dos fármacos foram preparadas em solução de ácido acético diluído (1:10000 utilizando ácido acético concentrado) para maximizar a solubilidade nas placas de ágar. A concentração final do fármaco foi baseada no volume total do ágar na placa (3 mL) somado do volume adicionado da solução do fármaco (0.12 mL). Quando os fármacos tinham DMSO como solvente, as placas controle foram também tratadas com DMSO como veículo na mesma concentração dos grupos tratados com fármacos. Um dia antes do experimento comportamental, um volume de 120 µL de fármaco diluído foi adicionado à placa previamente semeada com *E. coli* OP50. A solução contendo fármaco foi homogeneizada na placa de modo a cobrir inteiramente o ágar, exceto na região onde as bactérias se encontram (DONOHOE et al., 2006). Após adicionar os fármacos, as placas ficaram abertas até a solução contendo fármaco se imiscuir por completo ao ágar. As placas foram então fechadas e armazenadas ao abrigo da luz na temperatura de 20°C até o experimento no dia seguinte.

### **3.12 Comportamento de agregação**

O comportamento de agregação foi avaliado em placas previamente semeadas com bactérias OP50 e tratadas com fármacos, como descrito nos itens anteriores. Oitenta vermes hermafroditas adultos recentes foram transferidos sobre a camada circular de bactérias dispostas na placa de ágar. As placas foram incubadas por duas horas em estufa a 20°C. Após duas horas de exposição ao fármaco ou veículo, cada placa foi fotografada utilizando câmera DS-Fi1 acoplada ao estereomicroscópio Nikon SMZ 1500. O comportamento de agregação foi medido através do cálculo da fração de animais que estão em contato dois ou mais animais (DE BONO et al., 2002).

### **3.13 Instituições envolvidas**

Os métodos foram desenvolvidos em duas instituições. O experimento de marcação *in vivo* de lipídeos foi realizado no laboratório de Steven Farber vinculado ao Carnegie Institution of Washington (Baltimore, MD, Estados Unidos). Os outros experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Neurociências da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais e no Núcleo de Experimentação Animal, setor vinculado ao Centro de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

### **3.14 Análise estatística**

Os dados foram avaliados estatisticamente como descrito abaixo utilizando o programa Graphpad Prisma (Versão 5.0). Primariamente, para determinar se os dados seguiam função paramétrica, foi avaliado teste de normalidade Shapiro-Wilk, utilizando significância em  $p < 0.05$ . Quando o número amostral ( $n$ ) foi menor que seis, a normalidade foi avaliada pelo teste de Kolgomorov-Smirnov, utilizando significância em  $p < 0.05$ . Quando os valores amostrais seguirem uma distribuição paramétrica foi realizado teste multiparamétrico ANOVA de uma via

(quando várias doses foram comparadas) ou test-t de student (quando dois grupos foram comparados). Quando os valores amostrais não seguiram distribuição paramétrica foi realizado o teste de Kruskal-Wallis de uma variância (quando várias doses foram comparadas) ou teste Mann-Whitney (quando dois grupos foram comparados). Após os testes, foram realizados testes post-hoc para comparar quais grupos diferiam entre si, sendo utilizado o teste de Bonferroni para ANOVA e teste de Dunn para Kruskal-Wallis. Em todos os casos foi utilizado como significativo  $p < 0.05$ . Todas as figuras demonstram gráfico de barras demonstrando média  $\pm$  SEM (erro padrão das médias), exceto o gráfico de dispersão que apresenta mediana (Figura 28). As figuras demonstram as comparações significantes por meio de símbolos (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; #,  $p < 0.0001$ ). O número amostral de cada grupo está indicado nas legendas referentes à figura.



## 4 Resultados e discussão

### 4.1 Efeito de antipsicóticos e dopamina na absorção de vitelo endógeno por larvas de zebrafish.

A absorção do vitelo endógeno por embriões e larvas de zebrafish apresenta grande potencial como modelo de metabolismo de lipídeos. A mobilização do vitelo é mediada por enzimas e lipoproteínas que estão relacionadas tanto ao metabolismo do tecido adiposo quanto à absorção de lipídeos através do intestino (SCHLEGEL; STAINIER, 2007). Como o uso de antipsicóticos atípicos está associado ao desenvolvimento de efeitos adversos, principalmente no metabolismo de lipídeos, a mobilização de vitelo tem o potencial de ser um indicador desses efeitos colaterais.

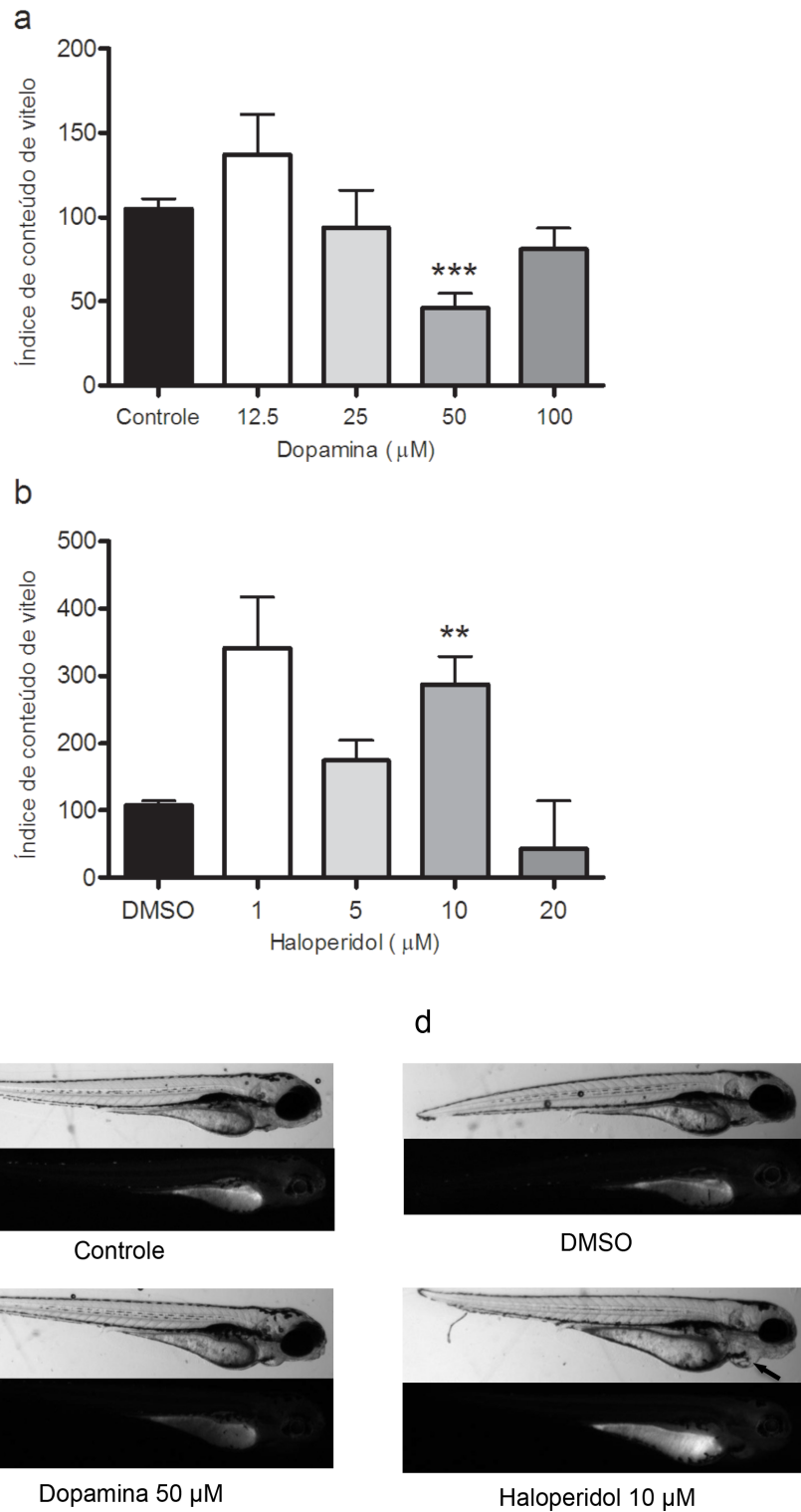
Para avaliar a absorção de vitelo por larvas de zebrafish foi utilizado método adaptado da literatura (JONES et al., 2008). Nessa técnica, o conteúdo lipídico *in vivo* é determinado com o uso do corante lipofílico fluorescente Nile Red. No método desenvolvido nesta tese, larvas de 2 dpf foram tratadas com concentrações crescentes de fármacos até 4 dpf, período no qual o conteúdo lipídico foi avaliado através de estereomicroscopia de fluorescência. O limite de idade de 4 dpf foi determinado após padronização experimental, visto que a boca e o intestino da larva já estão desenvolvidos no 5 dpf e o corante lipofílico é captado pelo tubo intestinal. Além disso, a presença do intestino provoca um excesso de fluorescência de fundo o que torna inviável captar imagem do saco vitelínico. A idade inicial de 2 dpf foi determinada para evitar as fases iniciais de desenvolvimento que são mais sensíveis ao tratamento farmacológico. O corante Nile Red foi administrado por um período de 16-18 horas (3 dpf a 4 dpf, overnight), o que permitiu a completa absorção e difusão do marcador nos tecidos da larva.

Após a padronização do método, o procedimento foi realizado em dois experimentos independentes. Em cada experimento, foram utilizadas larvas provenientes dos mesmos parentais, o que permitiu reduzir a variação do tamanho e qualidade do vitelo de cada larva.

Para verificar a validade do método, as larvas foram tratadas com concentrações crescentes de dopamina, visto que o agonismo dopaminérgico está relacionado com a atenuação dos efeitos metabólicos encontrados na diabetes e obesidade (SCISLOWSKI et al., 1999). Portanto, o resultado esperado após o tratamento com dopamina seria de redução do conteúdo lipídico do saco vitelínico.

Confirmando nossa previsão, o tratamento com dopamina reduziu significativamente o conteúdo lipídico na concentração de 50  $\mu\text{M}$  quando comparado com o controle, enquanto as outras concentrações não tiveram resultado significativo (Kruskal-Wallis;  $H_4 = 22.46$ ,  $p < 0.001$ ; post-hoc Dunn: controle vs. 50  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ ) (Figura 19a). Percebe-se que concentrações mais baixas e mais altas de dopamina não induziram alteração, com tendência a um aumento de conteúdo lipídico na concentração 12.5  $\mu\text{M}$ . Esse padrão de resposta bifásico é típico no agonismo dopaminérgico: os autoreceptores  $D_2$  são ativados por menor concentração de agonistas de dopamina que o necessário para ativar os receptores pós-sinápticos. Sabe-se que a ativação dos autoreceptores leva a uma menor liberação de dopamina endógena, enquanto a ativação de receptores pós-sinápticos pode levar ativação de outros comportamentos, como a atividade locomotora (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011). Assim, sugere-se que a dopamina é capaz de reduzir o conteúdo lipídico do saco vitelínico de larvas de zebrafish, embora o efeito não ocorra de maneira dependente da concentração.

Uma vez considerado o papel bifásico da ativação dos receptores dopaminérgicos, foi escolhido um antagonista potente do receptor  $D_2$ , o antipsicótico típico haloperidol, para verificar o efeito na mobilização do vitelo.



**Figura 19.** Efeito de dopamina e haloperidol na mobilização de vitelo em larvas de zebrafish. **a e b** - Índice de conteúdo de vitelo refere-se à área do saco vitelínico x intensidade média de fluorescência de Nile Red. Duração de tratamento foi de dois dias e as larvas foram avaliadas no

quarto dia após a fertilização. **a** – Curva de concentração de dopamina (n = controle: 38/ 12.5  $\mu$ M: 17/ 25  $\mu$ M: 16/ 50  $\mu$ M: 18/ 100  $\mu$ M: 18). Análise de Kruskal-Wallis indica significância ( $p < 0.001$ ). Teste post-hoc de Dunn demonstra que tratamento com 50  $\mu$ M de dopamina reduz significativamente o conteúdo lipídico quando comparado com controle (água como veículo) (indicado por \*\*\*,  $p < 0.001$ ). **b** – Curva de concentração de haloperidol (n = DMSO: 36/ 1  $\mu$ M: 17/ 5  $\mu$ M: 17/ 10  $\mu$ M: 17/ 20  $\mu$ M: 17). Análise de Kruskal-Wallis indica significância ( $p < 0.001$ ). Teste post-hoc de Dunn demonstra que tratamento com 10  $\mu$ M de haloperidol aumenta significativamente o conteúdo lipídico quando comparado com veículo (DMSO) (indicado por \*\*,  $p < 0.01$ ). **c** e **d** – Figuras representativas de imagem ótica e de fluorescência (Nile Red) de larvas de 4 dpf. **c** – Tratamento com dopamina aparentemente não causa nenhuma anormalidade morfológica. Notar a redução da intensidade de fluorescência na região do saco vitelínico na larva tratada com dopamina 50  $\mu$ M em comparação com a larva controle. **d** – Tratamento com haloperidol causa edema na cavidade cardíaca (seta preta) e intumescimento da região do saco vitelínico. Notar aumento da área do saco vitelínico e maior fluorescência na região do saco vitelínico da larva tratada com haloperidol 10  $\mu$ M em relação a larva tratada com veículo (DMSO). Gráficos apresentam média  $\pm$  SEM.

De forma interessante, o haloperidol mostrou-se capaz de levar um acúmulo de lipídeos apenas na concentração de 10  $\mu$ M quando comparado com veículo (Kruskal-Wallis;  $H_4 = 18.59$ ,  $p < 0.001$ ; Teste de Dunn: DMSO vs. 10  $\mu$ M,  $p < 0.01$ ) (Figura 19b). De novo, um efeito bifásico foi observado no tratamento com haloperidol, não sendo possível observar relação dependente da concentração. Entretanto, deve ser ressaltado que na concentração de 10  $\mu$ M podemos observar efeitos tóxicos na larva, como edema na cavidade cardíaca e intumescimento do saco vitelínico (Figura 19d). Enquanto isso, em nenhuma das concentrações utilizadas de dopamina foi verificado qualquer sinal de toxicidade (Figura 19c). Assim, não foi possível determinar se o aumento no conteúdo lipídico induzido por haloperidol é devido à ação farmacológica em  $D_2$  ou toxicidade inespecífica.

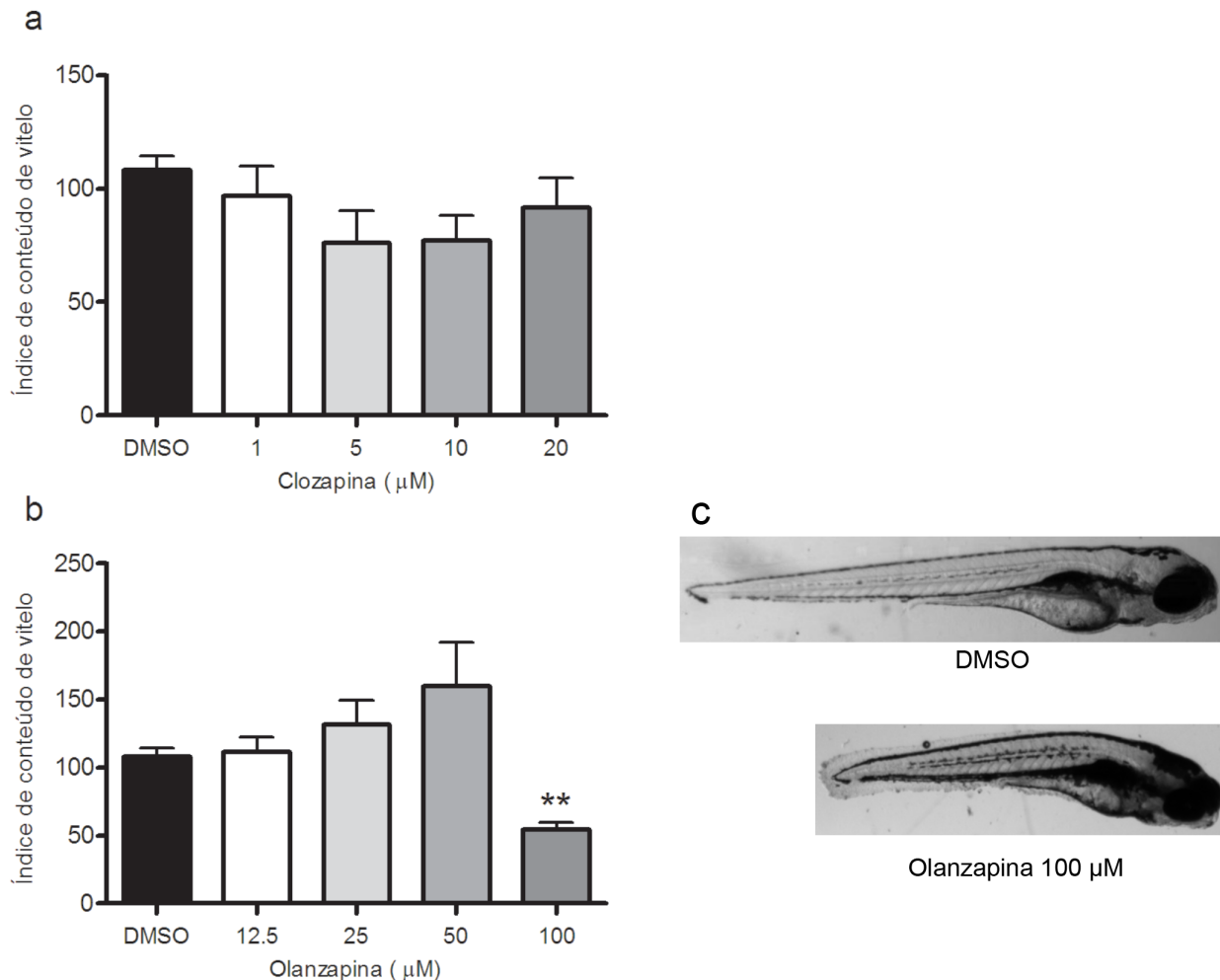
Com o intuito de verificar se o método é capaz de prever os efeitos metabólicos induzidos por antipsicóticos atípicos, foram escolhidos dois dos antipsicóticos mais associados a esses efeitos adversos, clozapina e olanzapina. Surpreendentemente, o tratamento com clozapina não induziu nenhuma

alteração no conteúdo lipídico do saco vitelínico (ANOVA de uma via;  $F_{4-99} = 1.914$ ,  $p = 0.114$ ) (Figura 20a), enquanto olanzapina, na dose mais alta (100  $\mu\text{M}$ ), levou a uma redução significativa do conteúdo lipídico (Kruskal-Wallis;  $H_4 = 21.38$ ,  $p < 0.001$ ; teste de Dunn: DMSO vs. 100  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.01$ ) (Figura 20b). Aparentemente, essa redução do conteúdo lipídico parece estar relacionada a efeitos tóxicos do tratamento, o que pode ser evidenciado pelo tamanho reduzido, corpo curvo e hiperpigmentado da larva (Figura 19c). Dessa forma, os resultados sugerem que o método não foi capaz de prever os efeitos metabólicos de antipsicóticos atípicos.

Embora tenha sido demonstrado que a dopamina e o haloperidol foram capazes de reduzir e aumentar, respectivamente, o conteúdo lipídico do saco vitelínico, o mesmo não pôde ser verificado com o tratamento com antipsicóticos atípicos. Como o efeito em vias de neurotransmissão são muitos complexos, diversas variáveis podem ter contribuído para esse resultado negativo. Por exemplo, o reduzido tempo de tratamento (dois dias) e a exposição contínua aos fármacos diluídos podem alterar a forma como o medicamento interage com o organismo.

O tratamento realizado em roedores e humanos é feito através de via oral e parenteral, o que significa uma exposição intermitente aos fármacos devido às variações das concentrações no plasma. Alguns estudos já demonstraram que os efeitos dos antipsicóticos são maiores quando a exposição é intermitente se comparado à exposição contínua (SAMAH et al., 2008) sugerindo que a exposição contínua leva a uma tolerância do efeito farmacológico. Uma outra ponderação seria que há grande probabilidade de a mobilização do vitelo não ser regulada pelo sistema nervoso central. Assim, para um fármaco alterar a mobilização de lipídeos teria que alterar uma ou mais das seguintes condições: (i) alterar o gasto metabólico da larva de forma global, o que faria aumentar ou reduzir a mobilização do vitelo; (ii) interagir de forma direta com os processos que regulam a mobilização do vitelo, modificando a atividade de certas enzimas, lipoproteínas e receptores. Portanto, pode ser sugerido que os antipsicóticos

atípicos não foram capazes de alterar significativamente essas condições, o que não exclui a possibilidade da modulação de outras vias.



**Figura 20.** Efeito de antipsicóticos atípicos na mobilização de vitelo em larvas de zebrafish. **a e b** - Índice de conteúdo de vitelo refere-se à área do saco vitelínico x intensidade média de fluorescência de Nile Red. Duração de tratamento foi de dois dias e as larvas foram avaliadas no quarto dia após fertilização. **a** - Curva de concentração de clozapina ((n = DMSO: 36/ 1  $\mu\text{M}$ : 16/ 5  $\mu\text{M}$ : 17/ 10  $\mu\text{M}$ : 17/ 20  $\mu\text{M}$ : 17). Análise multiparamétrica ANOVA de uma via não indica significância ( $p = 0.114$ ). **b** - Curva de concentração de (n = DMSO: 36/ 12.5  $\mu\text{M}$ : 16/ 25  $\mu\text{M}$ : 17/ 50  $\mu\text{M}$ : 15/ 100  $\mu\text{M}$ : 17). Análise de Kruskal-Wallis indica significância ( $p < 0.001$ ). Teste post-hoc de Dunn demonstra que tratamento com 100  $\mu\text{M}$  de olanzapina reduz significativamente o conteúdo lipídico quando comparado com veículo (DMSO) (indicado por \*\*,  $p < 0.01$ ). **c** - Figuras representativas de imagem ótica de larvas de 4 dpf. Larvas tratadas com 100  $\mu\text{M}$  de

olanzapina apresentam corpo curvo, tamanho reduzido e hiperpigmentação, enquanto larva tratada com veículo apresentada morfologia normal. Gráficos apresentam média  $\pm$  SEM.

#### **4.2 Efeito de antipsicóticos na agregação e dispersão de melanossomas de melanóforos em larvas de zebrafish**

Uma vez que a concentração tóxica de olanzapina induziu hiperpigmentação nas larvas (Figura 20c), verificou-se que a causa desse fenótipo era a dispersão massiva de melanossomas em melanóforos. Assim, foi hipotetizado que o comportamento de agregação/ dispersão de melanóforos de larvas de zebrafish pudesse ser utilizado como indicador de atividade de antipsicóticos.

Durante a padronização do experimento, observou-se que os melanóforos de larvas que desenvolveram na ausência de plano de fundo (sobre o gradeado na incubadora) não eram modulados pela iluminação do ambiente de maneira consistente. Assim, foi desenvolvido um plano de fundo que consistia de discos circulares de papel cartão verde que foram dispostos sob cada placa de Petri. A presença do plano de fundo verde no desenvolvimento das larvas permitiu que os melanóforos apresentassem uma rápida resposta à mudança de luminosidade. Larvas de 7 dpf foram utilizadas no experimento, e portanto apresentavam perfil de resposta de melanóforos semelhante a adultos, com melanossomas agregando na luz e dispersando no escuro (SHIRAKI; KOJIMA; FUKADA, 2010). Foi estabelecido um protocolo simples no qual as larvas foram tratadas com os antipsicóticos haloperidol ou clozapina por um período de 30 minutos no escuro e depois as mesmas larvas foram expostas por uma hora em ambiente com plano de fundo branco com incidência direta de luz fluorescente. O comportamento dos melanóforos foi interrompido no gelo e as larvas foram fixadas para avaliar a área de dispersão dos melanóforos através de microscopia ótica.

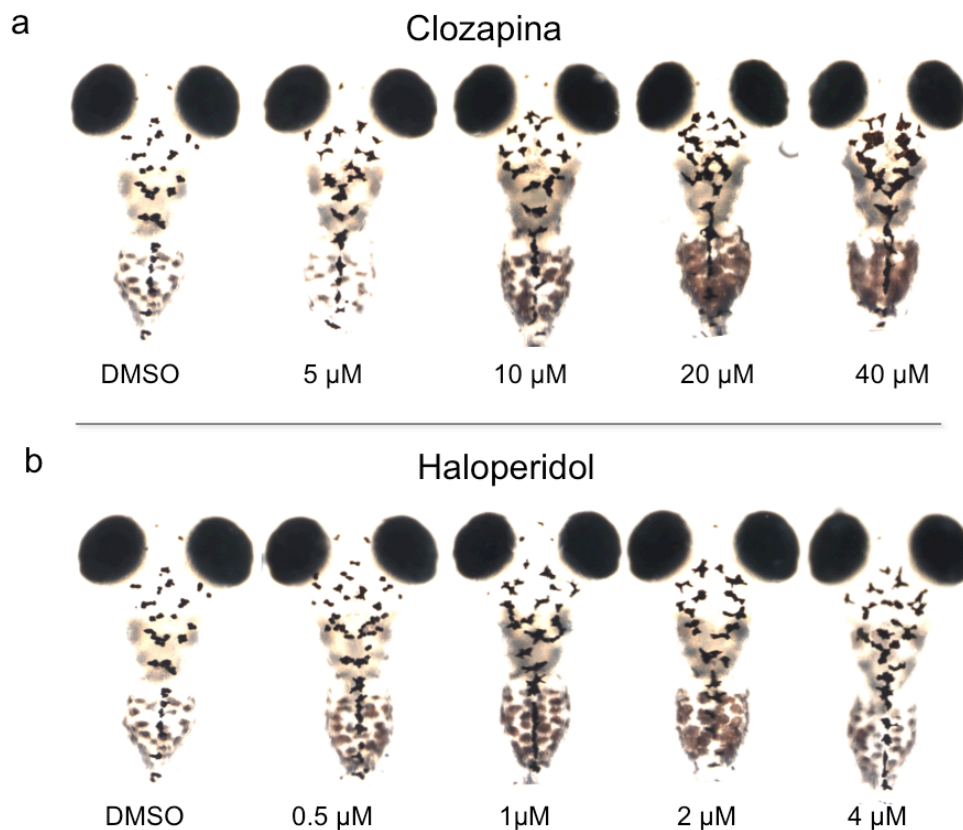
Tanto o antipsicótico atípico clozapina quanto antipsicótico típico haloperidol foram capazes de induzir a dispersão dos melanossomas nas larvas de

zebrafish (Figura 21). Entretanto, enquanto o tratamento com clozapina induziu uma dispersão mais visível dos melanossomos (Figura 21a), o haloperidol induziu uma dispersão de menor intensidade (Figura 21b). Para quantificar o tamanho da dispersão, foi avaliada a área de melanóforos da região dorsal da cabeça das larvas de zebrafish como indicado nos métodos. Através dessa quantificação, pode-se demonstrar que o tratamento com clozapina induziu dispersão significativa dos melanossomos nas concentrações de 10, 20 e 40  $\mu\text{M}$  quando comparado com DMSO (ANOVA de uma via;  $F_{4-44} = 23.98$ ,  $p < 0.0001$ ; Teste de Bonferroni: DMSO vs. 10, 20 e 40  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ ) (Figura 22a). O efeito de dispersão de clozapina seguiu uma relação dependente da concentração. Enquanto isso, o tratamento com haloperidol induziu dispersão significativa dos melanossomos apenas na concentração de 2  $\mu\text{M}$  quando comparado com o veículo (Kruskal-Wallis;  $H_4 = 15.85$ ,  $p < 0.01$ ; Teste de Dunn: DMSO vs. 2  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 22b).

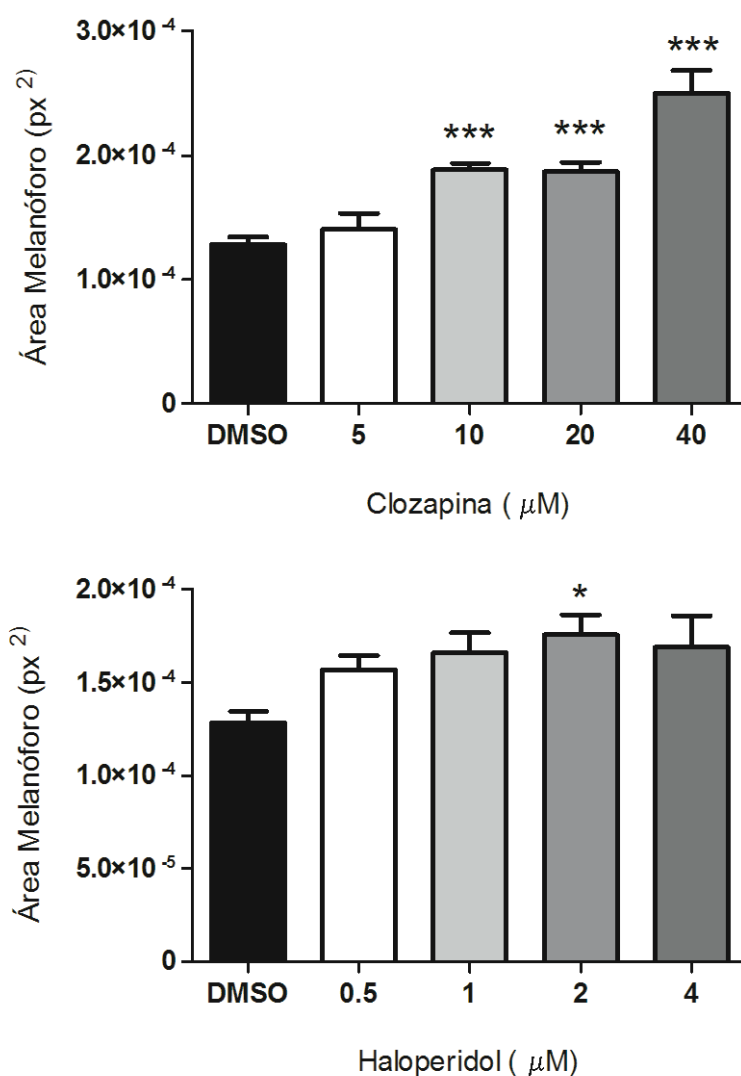
O tratamento com haloperidol também apresentou uma relação dependente da concentração, embora na concentração de 4  $\mu\text{M}$  o efeito parece ter saturado. De forma interessante, o tratamento com clozapina, na concentração de 40  $\mu\text{M}$ , foi capaz de quase duplicar a área dos melanóforos (195%), ao passo que o haloperidol, na concentração de 2  $\mu\text{M}$ , induziu um aumento consideravelmente menor (137%). Isso sugere que a clozapina possui um efeito mais intenso na dispersão dos melanóforos se comparado com o haloperidol, o que pode estar relacionado com o antagonismo de outros receptores, como os de serotonina.

Entretanto, a comparação entre os efeitos da clozapina e haloperidol é dificultada pois não há como determinar se as concentrações utilizadas são equivalentes (e.g., na clínica, a dose dos antipsicóticos é normalizada pela dose de clorpromazina).





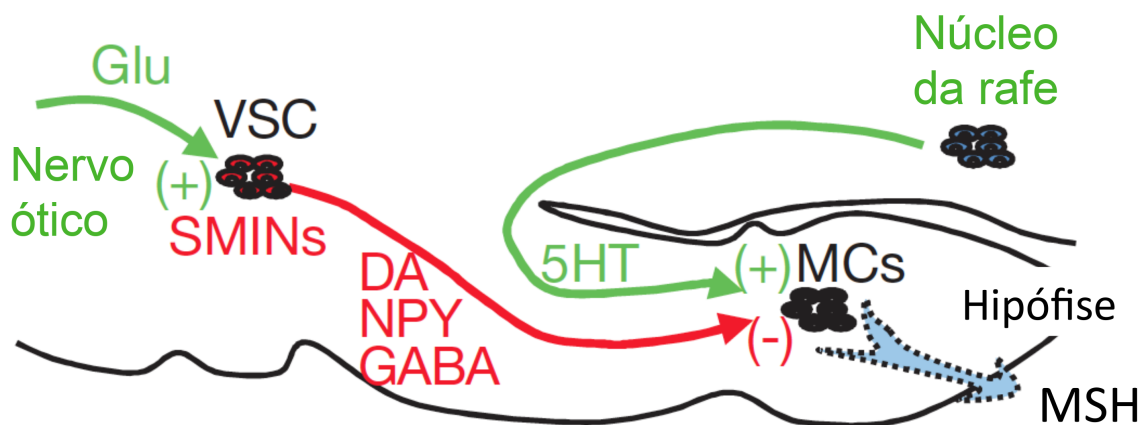
**Figura 21.** Efeito de antipsicóticos na dispersão de melanossomos de larvas. **a** e **b** – Imagens representativas da dispersão de melanóforos da região dorsal da cabeça de larvas de 7 dpf. **a** – Curva de concentração do antipsicótico clozapina na dispersão de melanóforos. **b** – Curva de concentração do antipsicótico haloperidol na dispersão de melanóforos.



**Figura 22.** Curva de concentração de antipsicóticos na dispersão de melanossomos de larvas. **a** e **b** – Efeito quantitativo dos antipsicóticos foi definido pela soma da área dos melanóforos (px<sup>2</sup>) na parte dorsal da cabeça de larvas de 7 dpf. **a** – Curva de concentração do antipsicótico clozapina (n = DMSO: 18/ 5 μM: 7/ 10 μM: 8/ 20 μM: 8/ 40 μM: 8). Análise multiparamétrica ANOVA de uma via indica que o tratamento com clozapina induziu dispersão de forma significativa (p < 0.0001) e teste post-hoc de Bonferroni indica que as concentrações de 10, 20 e 40 μM foram significativas em comparação ao DMSO (\*\*\*, p < 0.001). **b** – Curva de concentração do antipsicótico haloperidol (n = DMSO: 18/ 0.5 μM: 8/ 1 μM: 8/ 2 μM: 8/ 4 μM: 7). Análise de Kruskal-Wallis indica que o tratamento com haloperidol induziu dispersão de forma significativa (p < 0.0001) e teste post-hoc de Dunn indica que a concentração de 2 μM foi significativa em comparação ao DMSO (\*, p < 0.05). Gráficos apresentam média ± SEM.

O efeito de antipsicóticos na dispersão de melanóforos já tinha sido demonstrado em larvas do anfíbio *Xenopus* (rãs aquáticas). Nesse estudo, o tratamento com sulpirida, um potente antagonista do receptor D<sub>2</sub>, foi capaz de levar a dispersão de melanossomos mesmo na presença de ambiente iluminado (DULCIS; SPITZER, 2008). O controle dos melanóforos nos anfíbios é mediado por um circuito neural simples: a incidência de luz nas células ganglionares glutamatérgicas da retina leva a ativação de neurônios dopaminérgicos inibitórios da região supraquiasmática, que por sua vez exerce inibição das células colinérgicas liberadoras de MSH, chamadas de melanotrofas (TUINHOF et al., 1994) (Figura 23).

Dessa forma, a luz é capaz de inibir a liberação de MSH, evitando a dispersão dos melanossomos. Portanto, um antagonismo de receptor de dopamina retira a inibição dopaminérgica sobre as células melanotrofas, levando liberação de MSH, o que causa a dispersão dos melanossomos mesmo na presença de luz. Além da dopamina, vários outros neurotransmissores são capazes de modular a atividade e secreção de melanotrofos: enquanto GABA e NPY são inibitórios, serotonina e noradrenalina são excitatórios (ROUBOS; SCHEENEN; JENKS, 2005). Enquanto o circuito neural da via de MSH está bem estudado, a via de ativação dos neurônios hipotalâmicos produtores do hormônio concentrador de melanócito (MCH) não é muito bem compreendida (KAWAUCHI; BAKER, 2004).



**Figura 23.** Diagrama demonstrando circuito neuronal que controla o comportamento de agregação e dispersão de melanóforos. Células glutamatérgicas ganglionares da retina projetam até neurônios inibitórios dopaminérgicos do núcleo supraquiasmático (SMINs) que enervam as células colinérgicas secretoras de MSH (chamadas melanotrofas, MCs). O núcleo da rafe e o Locus coeruleus (não aparece na figura) também enervam as células melanotrofas. Fisiologicamente o sistema funciona da seguinte forma: luminosidade ativa as células ganglionares que por sua vez ativam os SMINs do núcleo supraquiasmático que por sua vez liberam dopamina e outros neurotransmissores (GABA e NPY) nas MCs. As MCs integram sinais excitatórios (serotonina e noradrenalina) e inibitórios (dopamina, GABA e NPY). Figura adaptada (DULCIS; SPITZER, 2008). Abreviação: VSC, núcleo supraquiasmático ventral.

Uma vez que não há muitos estudos sobre a influência de neurotransmissores centrais no controle de melanóforos em teleósteos, foi pressuposto que larvas de zebrafish apresentam circuitos neurais similares aos encontrados em anfíbios. Essa pressuposição procede tendo em vista que a regulação da atividade dos melanóforos é bastante conservada entre os vertebrados homeotérmicos (FUJII, 2000). A partir dessa pressuposição, pode-se discutir por quais mecanismos os antipsicóticos haloperidol e clozapina foram capazes de induzir a dispersão dos melanóforos.

O mecanismo de ação dos antipsicóticos pode ser deduzido a partir do perfil de afinidade desses fármacos. Por exemplo, sabe-se que o antipsicótico típico haloperidol é um potente antagonista do receptor de dopamina D<sub>2</sub>. Baseando-se nos circuitos neurais de controle dos melanotrofos, pode-se sugerir que o bloqueio dopaminérgico foi capaz de reduzir a ação inibitória da dopamina nas células melanotrofas da hipófise. Ao reduzir a inibição, o MSH foi liberado de forma endócrina até atingir seu receptor específico nos melanóforos, levando a dispersão dos melanossomas. Como já descrito, o mesmo fenômeno ocorreu em larvas de *Xenopus* tratadas com antipsicótico sulpirida, fármaco que apresenta alta potência pelo receptor D<sub>2</sub> (DULCIS; SPITZER, 2008). Deve ser ressaltado que o embora haloperidol antagonize predominantemente o receptor D<sub>2</sub>, esse fármaco também interage de maneira menos intensa com outros alvos, como receptor adrenérgico alfa<sub>1</sub>, dopamina D<sub>3</sub>, entre outros. Contudo, acredita-

se que o receptor D<sub>2</sub> seja de fato o responsável pelo efeito de dispersão do haloperidol.

Entretanto, as células melanotrofas não são reguladas apenas por dopamina, mas também por outros neurotransmissores (ROUBOS; SCHEENEN; JENKS, 2005) (Figura 22). A ativação das células melanotrofas depende da integração de sinais inibitórios (GABA, NPY e dopamina) e sinais excitatórios (serotonina e noradrenalina). Assim, um fármaco como a clozapina, que é capaz de interagir com vários alvos além do receptor de dopamina D<sub>2</sub>, apresenta maior propensão de modificar esse circuito neural. Portanto, sugere-se que a clozapina foi capaz de induzir uma dispersão dos melanossomos de forma mais intensa por causa do seu antagonismo múltiplo de receptores distintos.

Por causa da localização anatômica dos melanóforos no tegumento das larvas, pode-se pensar que essas células sofreriam de forma direta a ação de moléculas externas. Entretanto, os melanóforos de larvas de peixe residem na derme onde são protegidos da invasão de químicos por causa de uma barreira de difusão realizada pela epiderme (FUJII, 2000). Assim, os melanóforos estão expostos à moléculas que estão presentes na sistema interno da larva.

Entretanto, o experimento em questão não permite determinar se os efeitos dos antipsicóticos são indiretos, através do sistema nervoso central e hipófise, ou diretos, através de receptores expressos nos melanóforos. Em futuros experimentos, os melanóforos podem ser isolados e os fármacos testados em cultura *in vitro* para determinar se os antipsicóticos agem diretamente na dispersão dos melanossomos (WAGLE; MATHUR; GUO, 2011).

Portanto, o comportamento de dispersão de melanóforos pode ser utilizado como indicador de efeitos de antipsicóticos. Tanto antipsicóticos típicos como atípicos foram capazes de induzir a dispersão, embora o tratamento com clozapina tenha induzido um efeito maior que o do haloperidol. Dessa forma, o

teste não foi capaz de diferenciar antipsicótico atípico de típico. Outros fármacos que não apresentam antagonismo dopaminérgico precisam ser testados para verificar se a dispersão é dependente de antagonismo de dopamina.

#### **4.3 Efeito de antipsicóticos atípicos no comportamento de flotação e na atividade locomotora espontânea de larvas de zebrafish**

Durante o experimento de dispersão de melanossomos foi observado que as larvas tratadas com clozapina acumulavam-se na superfície do meio, algo que não acontecia no grupo controle. A partir dessa observação, perguntou-se se esse comportamento poderia ser utilizado para avaliar o efeito de antipsicóticos de forma sistemática. Foi desenvolvido, então, um teste que avaliasse o comportamento de flotação de larvas sob efeito de fármacos. Nesse teste, as larvas foram transferidas para tubos de ensaio de vidro (15 larvas por tubo) aos quais foram adicionadas concentrações crescentes de fármacos. Após tratamento agudo de 30 minutos, o comportamento das larvas foi gravado por meio de câmera filmadora, e posteriormente analisado de forma manual. Na análise, o comportamento de flotação foi dividido em dois comportamentos: acúmulo de larvas na superfície e acúmulo de larvas no fundo.

Ao longo da padronização, verificou-se que as larvas apresentavam uma grande variação comportamental tanto entre experimentos diferentes, quanto entre tubos idênticos do mesmo experimento. Assim, para reduzir a variação, foi avaliado o comportamento das mesmas larvas antes (basal) e após o tratamento com os fármacos. Essa modificação permitiu que o comportamento no tratamento fosse normalizado pelo comportamento basal, criando um índice que indica quantas vezes o tratamento modificou o comportamento basal.

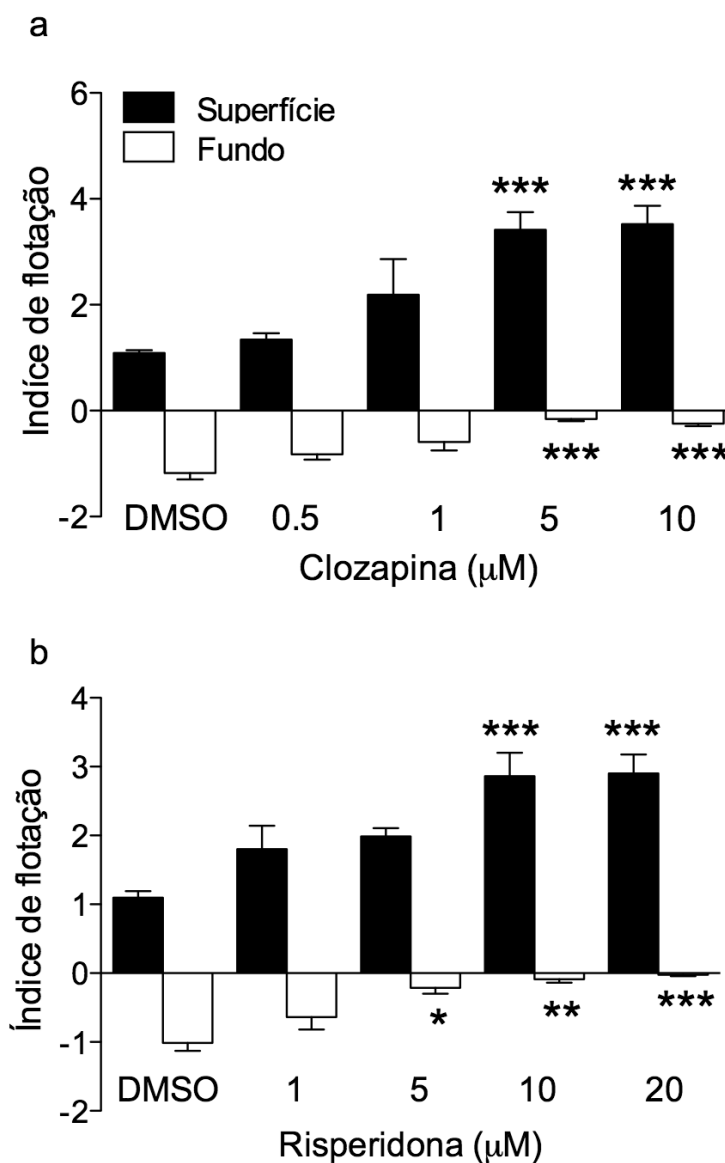
Com o intuito de avaliar se a observação inicial estava correta, primeiramente avaliamos o efeito de clozapina no comportamento de flotação de larvas (Figura 24a). Corroborando a nossa hipótese, o tratamento com clozapina induziu um

forte comportamento de flotação, com as larvas deixando o fundo do tubo para acumular quase totalmente na superfície. Assim, o tratamento foi significativo nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{M}$  quando comparados com veículo tanto para superfície (Kruskal-Wallis;  $H_4 = 59.46$ ,  $p < 0.0001$ ; Teste de Dunn: DMSO vs. 5 e 10  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ ) quanto para o fundo do tubo (Kruskal-Wallis;  $H_4 = 62.41$ ,  $p < 0.0001$ ; teste de Dunn: DMSO vs. 5 e 10  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ ).

Apesar da significância do tratamento com clozapina, esse resultado não pode sugerir automaticamente que outros antipsicóticos terão a mesma atividade sobre o comportamento de flotação. A clozapina, como descrito anteriormente, apresenta grande afinidade com vários receptores (ROTH; SHEFFLER; KROEZE, 2004) (Figura 2), tendo um perfil farmacológico chamado clinicamente de 'sujo'. Além disso, a clozapina é considerada o padrão ouro dos antipsicóticos, apresentando superioridade clínica sobre os demais (VOLAVKA, 2012). O efeito de flotação pode ter sido induzido, por exemplo, por uma atividade anticolinérgica (antagonismo de receptores muscarínicos) da clozapina, o que poderia alterar o controle do sistema nervoso autônomo sobre o comportamento de flotação.

Para verificar se outro fármaco teria atividade similar sobre o comportamento de flotação, foi escolhido o antipsicótico risperidona, uma vez que é da mesma classe da clozapina (antipsicóticos atípicos). Apesar de ser da mesma classe, o perfil farmacológico da risperidona é bastante diferente da clozapina, apresentando alta afinidade pelos receptores 5-HT<sub>2a</sub> e D<sub>2</sub> e praticamente nenhuma atividade anticolinérgica (Figura 2). Apesar do perfil farmacológico distinto, o tratamento com risperidona foi capaz de induzir comportamento de flotação similar ao induzido pelo tratamento com clozapina (Figura 24b). Risperidona aumentou significativamente a quantidade de larvas na superfície do tubo nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{M}$  quando comparado ao veículo (Kruskal-Wallis;  $H_4 = 25.57$ ,  $p < 0.0001$ ; teste de Dunn: DMSO vs. 10 e 20  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ ). Enquanto isso, a redução de larvas no fundo do tubo mostrou-se mais

sensível e o tratamento com risperidona foi significativo nas concentrações de 5, 10 e 20  $\mu\text{M}$  quando comparado ao veículo (Kruskal-Wallis;  $H_4 = 27.96$ ,  $p < 0.0001$ ; teste de Dunn: DMSO vs. 5,  $p < 0.05$ ; DMSO vs. 10,  $p < 0.01$  e DMSO vs. 20  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ ).



**Figura 24.** Curva de concentração de antipsicóticos atípicos no comportamento de flotação de larvas. **a** e **b** – Efeito dos antipsicóticos foi definido através de um índice de flotação que é determinado pela razão entre flotação no tratamento e flotação no estado basal. **a** – Curva de concentração do antipsicótico clozapina ( $n = \text{DMSO}: 30/ 0.5 \mu\text{M}: 9/ 1 \mu\text{M}: 9/ 5 \mu\text{M}: 30/ 10 \mu\text{M}: 14$ ). Tratamento com clozapina aumentou significativamente a quantidade de larvas na superfície



(Kruskal-Wallis,  $p < 0.0001$ ; teste de Dunn: DMSO vs. 5 e 10  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ , indicado na figura por \*\*\*) e reduziu a quantidade de larvas no fundo do tubo (Kruskal-Wallis,  $p < 0.0001$ ; teste de Dunn: DMSO vs. 5 e 10  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ , indicado na figura por \*\*\*) quando comparado ao veículo **b** – Curva de concentração do antipsicótico risperidona ( $n = \text{DMSO}: 8/ 1 \mu\text{M}: 8/ 5 \mu\text{M}: 8/ 10 \mu\text{M}: 8/ 20 \mu\text{M}: 8$ ). Tratamento com risperidona aumentou significativamente a quantidade de larvas na superfície (Kruskal-Wallis,  $p < 0.0001$ ; teste de Dunn: DMSO vs. 10 e 20  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ , indicado por \*\*\*) e reduziu o número de larvas no fundo do tubo (Kruskal-Wallis;  $H_4 = 27.96$ ,  $p < 0.0001$ ; teste de Dunn: DMSO vs. 5  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.05$ ; DMSO vs. 10  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.01$  e DMSO vs. 20  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ , indicado por \*, \*\* e \*\*\*, respectivamente) quando comparado ao veículo. Gráficos apresentam média  $\pm$  SEM.

O efeito similar dos antipsicóticos clozapina e risperidona indica um mecanismo de ação convergente entre ambos os fármacos. Ao analisar o perfil farmacológico de ambos antipsicóticos (Figura 2) vários receptores surgem como possível (ou possíveis, se envolver mais de um receptor) alvo na indução do comportamento de flotação. Por exemplo, o antagonismo nos receptores dopaminérgicos ( $D_2$ ,  $D_3$  e  $D_4$ ), histaminérgicos ( $H_1$ ), serotoninérgicos ( $5\text{-HT}_{2a}$  e  $5\text{-HT}_{2c}$ ) e adrenérgicos ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ) podem estar envolvidos no mecanismo de ação. Dessa forma, procurou-se utilizar antagonistas específicos desses receptores, pois poderiam estar envolvidos na indução do comportamento de flotação.

Uma vez que o antagonismo de  $D_2$  é característica de todos antipsicóticos (KAPUR; REMINGTON, 2001), foi avaliado o efeito do haloperidol no comportamento de flotação de larvas (Figura 25a). O tratamento com haloperidol aumentou significativamente a quantidade de larvas na superfície nas concentrações de 0.6, 2.4 e 6  $\mu\text{M}$  quando comparado ao veículo (ANOVA de uma via;  $F_{5-94} = 9.272$ ,  $p < 0.0001$ ; teste de Bonferroni: DMSO vs. 0.6, 2.4 e 6  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ ). Além disso, o tratamento com haloperidol também reduziu de forma significativa a quantidade de larvas no fundo do tubo nas concentrações de 0.6 e 2.4  $\mu\text{M}$  quando comparado ao veículo (Kruskal-Wallis;  $H_5 = 31.47$ ,  $p < 0.0001$ ; teste de Dunn: DMSO vs. 0.6  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.01$ ; DMSO vs. 2.4  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ ). Os resultados sugerem, portanto, que o antagonismo do receptor  $D_2$  está

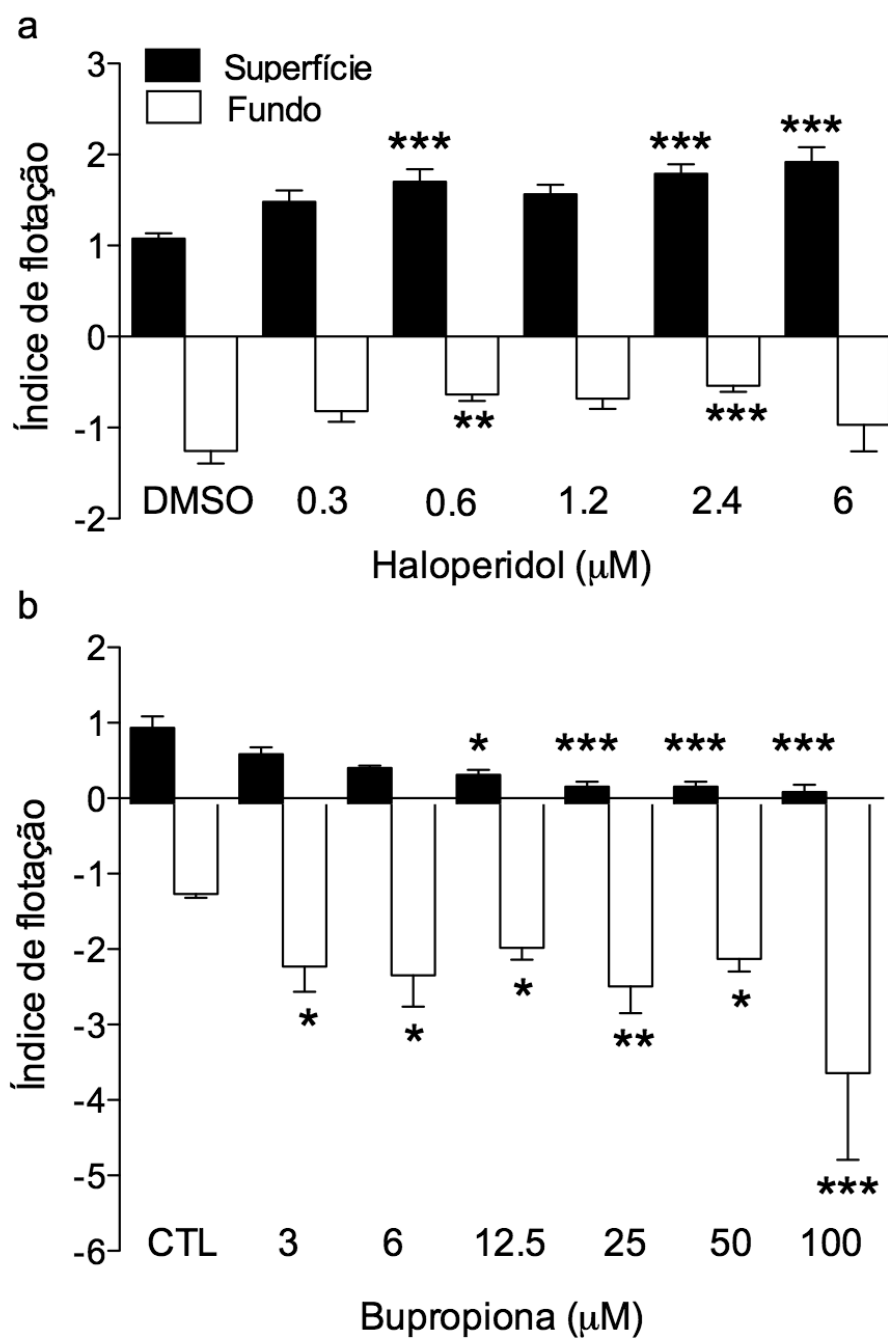
envolvido no comportamento de flotação. Deve ser ressaltado que, embora o tratamento com haloperidol tenha sido significativo, ele foi visivelmente menor que o observado no tratamento com antipsicóticos atípicos. Por exemplo, clozapina, na concentração de 5  $\mu\text{M}$ , e risperidona, na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , tiveram em média um efeito de 3.4 e 2.9 vezes no aumento da quantidade de larvas na superfície, respectivamente. Enquanto isso, haloperidol, na concentração de 2.4  $\mu\text{M}$ , teve em média um efeito de 1.9 vezes no aumento do número de larvas. Isso indica o antagonismo de  $D_2$  exerce um efeito parcial quando comparado efeito induzido pelos antipsicóticos atípicos.

O tratamento com haloperidol não seguiu um efeito dependente da concentração. Dessa forma, a concentração de 1.2  $\mu\text{M}$  de haloperidol não foi significativa tanto para superfície quanto para o fundo. Isso parece estar ligado ao comportamento bifásico dos receptores  $D_2$ , já citado anteriormente. Além disso, enquanto a concentração de 6  $\mu\text{M}$  aumentou significativamente o número de larvas na superfície, não foi significativa a redução do número de larvas no fundo. Um número maior de larvas no fundo pode estar relacionado com efeito tóxico do haloperidol nessa concentração.

Segundo esses resultados, o antagonismo de  $D_2$  parece ser um dos mecanismos envolvidos no comportamento de flotação. Portanto, seria possível induzir um comportamento oposto ao utilizar um agonista dopaminérgico?

Dessa forma, escolheu-se bupropiona, um antidepressivo que inibe a recaptação dopamina, para avaliar o efeito do agonismo dopaminérgico no comportamento de flotação. De forma oposta ao haloperidol, o tratamento com bupropiona reduziu significativamente a quantidade de larvas na superfície (Kruskal-Wallis;  $H_6 = 34.42$ ,  $p < 0.0001$ ; teste de Dunn: controle vs. 12.5  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.05$ ; controle vs. 25, 50 e 100  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ ) enquanto aumentou o número de larvas no fundo quando comparado ao controle (Kruskal-Wallis;  $H_6 = 31.22$ ,  $p < 0.0001$ ; teste de Dunn: controle vs. 3, 6, 12.5 e 50  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.05$ ; controle vs. 25  $\mu\text{M}$ ,  $p <$

0.01; controle vs. 100  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ ) (Figura 25b). Os resultados demonstram, portanto, que a dopamina produzida endogenamente é capaz de aumentar o número de larvas no fundo de uma coluna d'água, o oposto do observado com o tratamento com antipsicóticos.



**Figura 25.** Curva de concentração de haloperidol e bupropiona no comportamento de flotação de larvas. **a e b** – Efeito dos fármacos foi definido através de um índice de flotação que é determinado pela razão entre flotação no tratamento e flotação no estado basal. **a** – Curva de concentração do antipsicótico haloperidol (n = DMSO: 27/ 0.3  $\mu$ M: 10/ 0.6  $\mu$ M: 14/ 1.2  $\mu$ M: 11/ 2.4  $\mu$ M: 26/ 6  $\mu$ M: 12). Tratamento com haloperidol aumentou significativamente a quantidade de larvas na superfície (ANOVA de uma via,  $p < 0.0001$ ; teste de Bonferroni: DMSO vs. 0.6, 2.4 e 6  $\mu$ M,  $p < 0.001$ , indicado por \*\*\*) e reduziu a quantidade de larvas no fundo do tubo (Kruskal-Wallis,  $p < 0.0001$ ; teste de Dunn: DMSO vs. 0.6  $\mu$ M,  $p < 0.01$ , indicado por \*\*; DMSO vs. 2.4  $\mu$ M,  $p < 0.001$ , indicado por \*\*\*) quando comparado ao controle. **b** – Curva de concentração do antidepressivo bupropiona (n = controle: 14/ 3  $\mu$ M: 6/ 6  $\mu$ M: 6/ 12.5  $\mu$ M: 11/ 25  $\mu$ M: 8/ 50  $\mu$ M: 8/ 100  $\mu$ M: 8). Tratamento com bupropiona reduziu significativamente a quantidade de larvas na superfície (Kruskal-Wallis,  $p < 0.0001$ ; teste de Dunn: controle vs. 12.5  $\mu$ M,  $p < 0.05$ , indicado por \*; controle vs. 25, 50 e 100  $\mu$ M,  $p < 0.001$ , indicado por \*\*\*) e aumentou o número de larvas no fundo do tubo (Kruskal-Wallis;  $H_6 = 31.22$ ,  $p < 0.0001$ ; teste de Dunn: controle vs. 3, 6, 12.5 e 50  $\mu$ M,  $p < 0.05$ ; controle vs. 25  $\mu$ M,  $p < 0.01$ ; controle vs. 100  $\mu$ M,  $p < 0.001$ ) quando comparado ao veículo. Gráficos apresentam média  $\pm$  SEM.

Um dos problemas é que a bupropiona também bloqueia a recaptação de noradrenalina, então o efeito poderia estar sendo mediado por aumento da via adrenérgica. Sabe-se, por exemplo, que a deflação da bexiga natatória de zebrafish adulto é estimulada diretamente por noradrenalina através de receptores beta-adrenérgicos (DUMBARTON et al., 2010). Entretanto, a concentração máxima de bupropiona (100  $\mu$ M) foi inferior à utilizada em estudo sobre o papel da dopamina na atividade locomotora de larvas de zebrafish, no qual foi utilizada concentração 200  $\mu$ M (THIRUMALAI; CLINE, 2008). Além disso, o fármaco bupropiona possui duas vezes mais afinidade pelo transportador de dopamina do que pelo transportador de noradrenalina (HORST; PRESKORN, 1998). Isso sugere que bupropiona induziu o comportamento através da via dopaminérgica, porém não é possível excluir totalmente se há componente adrenérgico envolvido.

Enfim, o comportamento de flotação parece ser controlado de forma parcial pela modulação da via dopaminérgica. Dessa forma, sugere-se que outros receptores controlam de forma aditiva ou sinérgica o comportamento de flotação juntamente

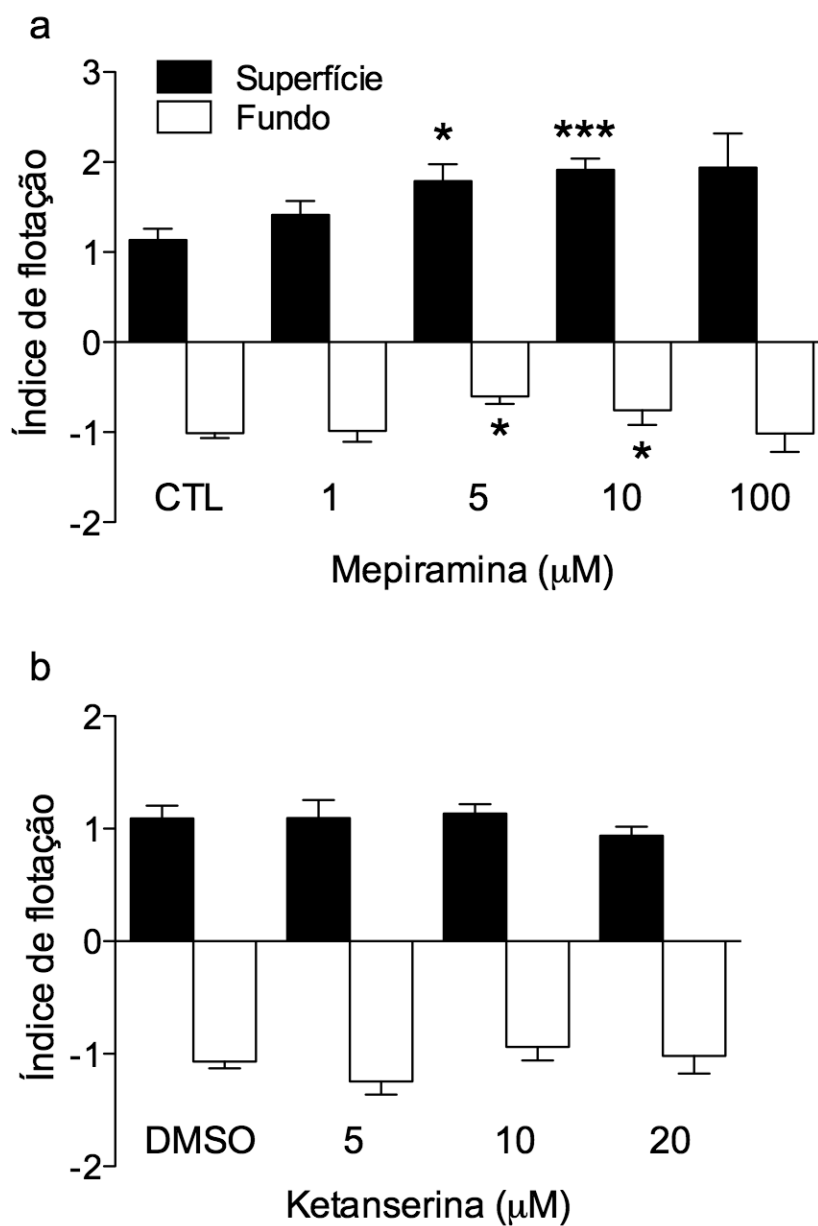
com o receptor  $D_2$ . Dentre os possíveis alvos, decidiu-se investigar primeiramente o papel dos receptores histaminérgicos  $H_1$ . Os antipsicóticos clozapina e risperidona apresentam alta afinidade pelo receptor  $H_1$  (clozapina > risperidona), e se portam como agonistas inversos, reduzindo a atividade intrínseca do receptor (BAKKER et al., 2007). Portanto, para investigar o papel do receptor  $H_1$ , foi escolhido o fármaco mepiramina, um seletivo e potente agonista inverso do receptor  $H_1$  (VAN DER GOOT; TIMMERMAN, 2000).

O antagonista mepiramina já tinha sido utilizado anteriormente em larvas de zebrafish (5 dpf), nas concentrações de 1 a 100  $\mu\text{M}$ , para avaliar seu efeito na atividade locomotora (PEITSARO et al., 2007). Assim, as concentrações utilizadas no comportamento de flotação foram baseadas nesse trabalho. O tratamento com mepiramina aumentou a quantidade de larvas na superfície do tubo nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{M}$  quando comparado ao controle (Kruskal-Wallis;  $H_4 = 26.15$ ,  $p < 0.0001$ ; teste de Dunn: controle vs. 5  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.05$ ; controle vs.  $p < 0.001$ ) (Figura 26a). Consequentemente, mepiramina também reduziu a quantidade de larvas no fundo nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{M}$  quando comparado ao controle (Kruskal-Wallis;  $H_4 = 15.22$ ,  $p < 0.001$ ; teste de Dunn: controle vs. 5 e 10  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.05$ ).

Dessa forma, a mepiramina foi capaz de induzir um comportamento de flotação de maneira similar aos antipsicóticos atípicos. Porém, enquanto mepiramina, na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , aumentou 1.9 vezes em média a quantidade de larvas na superfície, clozapina foi capaz de aumentar a quantidade de larvas cerca de 3.4 vezes, na concentração de 5  $\mu\text{M}$ . Isso sugere que, tal como haloperidol, o tratamento com mepiramina induz um efeito parcial do comportamento de flotação quando comparado ao efeito dos antipsicóticos atípicos. Assim, o receptor de histamina  $H_1$  parece compor um dos mecanismos de ação de indução do comportamento de flotação.

Deve ser ressaltado que mepiramina não alterou o comportamento de flotação na concentração de 100  $\mu\text{M}$  o que pode estar relacionado à toxicidade dessa concentração. Corroborando com esse dado, foi relatado que a concentração de 100  $\mu\text{M}$  de mepiramina foi a única a alterar drasticamente a atividade locomotora de larvas de zebrafish (PEITSARO et al., 2007). Além disso, sabe-se que mepiramina pode interagir com outros alvos em alta concentração, como receptores muscarínicos, receptor de histamina  $\text{H}_2$  e transportadores de monoaminas (VAN DER GOOT; TIMMERMAN, 2000). Isso sugere que as significâncias encontradas nas concentrações de 5 e 10  $\mu\text{M}$  refletem um antagonismo real do receptor  $\text{H}_1$ , enquanto na concentração 100  $\mu\text{M}$  inicia-se interação com outros receptores.

Outro alvo que os antipsicóticos clozapina e risperidona interagem com grande afinidade é o receptor de serotonina  $5\text{-HT}_{2a}$  (risperidona > clozapina). Os antipsicóticos atípicos antagonizam o receptor  $5\text{-HT}_{2a}$  através de agonismo inverso (WEINER et al., 2001), reduzindo a atividade intrínseca do receptor. Dessa forma, para avaliar o papel do receptor  $5\text{-HT}_{2a}$ , foi escolhido o fármaco ketanserina, um antagonista seletivo do receptor  $5\text{-HT}_{2a}$  (LEYSEN et al., 1981) que também apresenta agonismo inverso (EGAN; HERRICK-DAVIS; TEITLER, 1998). O tratamento com ketanserina (concentrações de 5, 10 e 20  $\mu\text{M}$ ) não alterou o comportamento de flotação tanto na superfície (ANOVA de uma via;  $F_{3-28} = 0.570$ ,  $p = 0.639$ ) quanto no fundo (ANOVA de uma via;  $F_{3-28} = 1.196$ ,  $p = 0.329$ ) quando comparado ao veículo (Figura 26b). Esse resultado sugere que o antagonismo do receptor  $5\text{-HT}_{2a}$  não está envolvido no comportamento de flotação.



**Figura 26.** Curva de concentração de mepiramina e ketanserina no comportamento de flotação de larvas. **a** e **b** – Efeito dos fármacos foi definido através de um índice de flotação que é determinado pela razão entre flotação no tratamento e flotação no estado basal. **a** – Curva de concentração do antihistamínico mepiramina (n = controle: 22/ 1  $\mu\text{M}$ : 14/ 5  $\mu\text{M}$ : 9/ 10  $\mu\text{M}$ : 21/ 100  $\mu\text{M}$ : 8). Tratamento com mepiramina aumentou significativamente a quantidade de larvas na superfície Kruskal-Wallis,  $p < 0.0001$ ; teste de Dunn: controle vs. 5  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.05$ , indicado por \*; controle vs.  $p < 0.001$ , indicado por \*\*\*) e reduziu a quantidade de larvas no fundo do tubo quando comparado ao controle (Kruskal-Wallis,  $p < 0.001$ ; teste de Dunn: controle vs. 5 e 10  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.05$ ; indicado por \*) **b** – Curva de concentração de ketanserina (n = DMSO: 8/ 5  $\mu\text{M}$ : 8/

10  $\mu\text{M}$ : 8/ 20  $\mu\text{M}$ : 8). Tratamento com ketanserina não alterou significativamente a quantidade de larvas na superfície (ANOVA de uma via,  $p = 0.639$ ) e nem no fundo do tubo (ANOVA de uma via,  $p = 0.329$ ) quando comparado ao veículo. Gráficos apresentam média  $\pm$  SEM.

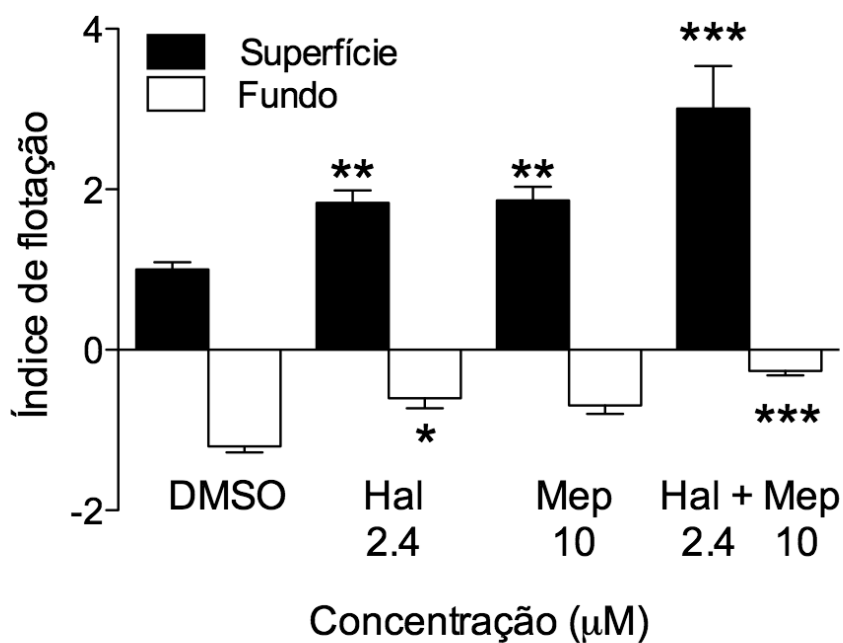
Portanto, dentre os receptores avaliados, sugere-se que o antagonismo dos receptores  $D_2$  e  $H_1$  esteja envolvido no comportamento de flotação. Porém, o efeito de cada antagonismo parece ser parcial se comparado ao efeito dos antipsicóticos atípicos. Assim, foi hipotetizado que, ao combinar o antagonismo de  $D_2$  e  $H_1$ , o efeito no comportamento de flotação seria aditivo ou sinérgico, com resultados similares aos observados com antipsicóticos atípicos. Dessa forma, foi avaliado o efeito combinado dos antagonistas haloperidol e mepiramina sobre o comportamento de flotação das larvas de zebrafish (Figura 27). As concentrações escolhidas foram baseadas nas que foram significativas nos experimentos anteriores, sendo de 2.4  $\mu\text{M}$  para haloperidol e de 10  $\mu\text{M}$  para mepiramina.

Análise de Kruskal-Wallis indica que o tratamento foi significativo tanto para o aumento da quantidade de larvas na superfície (Kruskal-Wallis;  $H_3 = 28.42$ ,  $p < 0.0001$ ) como para redução de larvas no fundo do tubo (Kruskal-Wallis;  $H_3 = 24.52$ ,  $p < 0.0001$ ) (Figura 27). O teste post-hoc de Dunn indica que as concentrações de 2.4  $\mu\text{M}$  de haloperidol, 10  $\mu\text{M}$  de mepiramina e os dois antagonistas combinados aumentaram significativamente a quantidade de larvas na superfície quando comparado ao veículo (haloperidol 2.4  $\mu\text{M}$  e mepiramina 10  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.01$ ; haloperidol 2.4  $\mu\text{M}$  + mepiramina 10  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ ). Além disso, haloperidol 2.4  $\mu\text{M}$  e a combinação haloperidol-mepiramina foram capazes de reduzir a quantidade de larvas do fundo do tubo quando comparado ao veículo (haloperidol 2.4  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.05$ ; haloperidol 2.4  $\mu\text{M}$  + mepiramina 10  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ ).

O tratamento combinado aumentou de forma muito mais significativa a quantidade de larvas na superfície ( $p < 0.001$ ), com probabilidade de significância 10 vezes maior quando comparado com os tratamentos com um



único antagonista ( $p < 0.01$ ). Além disso, o tratamento combinado também reduziu a quantidade de larvas no fundo tubo ( $p < 0.001$ ), com significância cerca de 200 vezes maior que o tratamento com  $2.4 \mu\text{M}$  de haloperidol ( $p < 0.05$ ). Outro ponto a ser ressaltado é que o efeito combinado de haloperidol e mepiramina aumentou, em média, 3 vezes a quantidade de larvas na superfície, de forma similar aos antipsicóticos atípicos (clozapina: 3.4 vezes e risperidona 2.9 vezes). Isso indica que o antagonismo combinado dos receptores  $D_2$  e  $H_1$  resulta em efeito aditivo no comportamento de flotação, com as larvas apresentando comportamento similar ao observado no tratamento com antipsicóticos atípicos.



**Figura 27.** Efeito combinado de haloperidol e mepiramina no comportamento de flotação de larvas. Efeito dos fármacos foi definido através de um índice de flotação que é determinado pela razão entre flotação no tratamento e flotação no estado basal ( $n = \text{DMSO}: 13/ \text{haloperidol } 2.4 \mu\text{M}: 12/ \text{mepiramina } 10 \mu\text{M}: 11/ \text{haloperidol } 2.4 \mu\text{M} + \text{mepiramina } 10 \mu\text{M} : 11$ ). Análise de Kruskal-Wallis indica que o tratamento foi significativo tanto para o aumento da quantidade de larvas na superfície (Kruskal-Wallis,  $p < 0.0001$ ; teste de Dunn: DMSO vs. haloperidol  $2.4 \mu\text{M}$  e mepiramina  $10 \mu\text{M}$ ,  $p < 0.01$ , indicado por \*\*; DMSO vs. haloperidol  $2.4 \mu\text{M} + \text{mepiramina } 10 \mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ , indicado por \*\*\*) como para redução de larvas no fundo do tubo (Kruskal-Wallis,  $p <$

0.0001; teste de Dunn: DMSO vs. haloperidol 2.4  $\mu\text{M}$   $p < 0.05$ , indicado por \*; DMSO vs. haloperidol 2.4  $\mu\text{M}$  + mepiramina 10  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ , indicado por \*\*\*). Gráfico apresenta média  $\pm$  SEM.

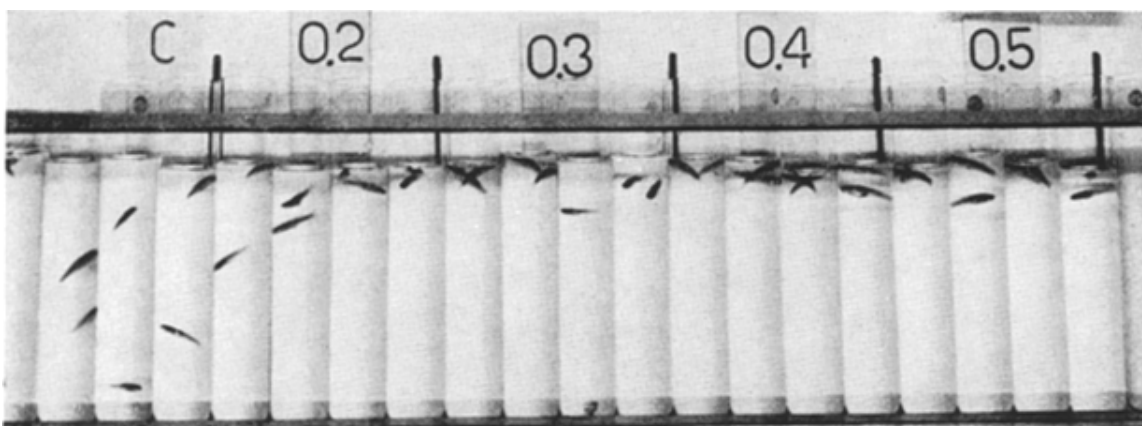
Coincidentemente, a administração intramuscular combinada de haloperidol e prometazina (Fenergan), um antihistamínico com propriedade sedativa, é amplamente utilizada na clínica em países como Brasil e Índia (HUF et al., 2002). uso combinado é recomendado para a rápida tranquilização de pacientes agitados/violentos com histórico de doença mental. A adição da prometazina parece facilitar a sedação e prevenir os sintomas extrapiramidais, particularmente a distonia, que está associado ao uso de haloperidol (BREIER et al., 2002). Em um estudo clínico sobre tratamento agudo de pacientes agitados, foi demonstrado que o uso do haloperidol combinado com prometazina é melhor que haloperidol sozinho devido efeito mais rápido e menor incidência de efeitos extrapiramidais (HUF; COUTINHO; ADAMS, 2007).

Em outro estudo, no qual comparou-se o uso combinado de haloperidol-prometazina com olanzapina, foi relatado que o uso combinado apresentou efeitos terapêuticos mais prolongados que olanzapina, necessitando de menor intervenção médica após a primeira administração (RAVEENDRAN et al., 2007). Além disso, a combinação haloperidol-prometazina parece provocar sedação de forma mais rápida que lorazepam (benzodiazepínico), o que pode ser útil para alguns pacientes (ALEXANDER et al., 2004). De forma similar, o comportamento de flotação foi mais intenso com o uso combinado de haloperidol-mepiramina do que haloperidol ou mepiramina sozinho. Assim, sugere-se que mepiramina parece ser capaz de aumentar o efeito farmacológico de haloperidol e vice-versa, ao mesmo tempo que mepiramina parece atenuar algum sintoma motor causado pelo haloperidol.

O comportamento de flotação (chamado de 'surfacing' em inglês) de peixes possui potencial pouco aproveitado na avaliação de fármacos que atuam no sistema nervoso central. O primeiro estudo que se tem notícia, verificou que LSD

diluído na água é capaz de induzir peixes *Betta splendens* a nadarem por até seis horas na superfície da coluna d'água (ABRAMSON; EVANS, 1954). Um comportamento similar foi demonstrado em zebrafish adultos expostos à LSD, com os peixes permanecendo consideravelmente mais tempo na superfície quando comparado ao controle (GROSSMAN et al., 2010).

Quanto aos antipsicóticos, o primeiro estudo demonstrou que exposição à clorpromazina induziu comportamento de flotação em três espécies de peixes (dourado - *Carassius auratus*, guppy – *Lebistes reticulatus* e tetra-cego *Anoptichthys hubbsy*) (CUTTING et al., 1959). Além disso, outro artigo demonstrou a possibilidade de utilizar o comportamento de flotação de peixes-mosquito adultos (*Gambusia affinis*) para estimar a presença de clorpromazina diluída em água (AVIVI; CHARI-BITRON, 1970). Interessantemente, esse artigo utilizou uma estratégia de avaliação similar à utilizada nesta tese, onde os peixes foram dispostos em tubos de vidro e submetidos a uma curva de concentração de clorpromazina (Figura 28). Nesse estudo, uma concentração de 1.4  $\mu\text{M}$  de clorpromazina foi suficiente para acumular os peixes-mosquito na superfície após 30 minutos de tratamento.



**Figura 28.** Peixes-mosquito adultos (*Gambusia affinis*) tiveram o comportamento de flotação ('surfacing') induzido após tratamento de duas horas com clorpromazina (concentrações de 0-0.5  $\mu\text{g/mL}$ ). Figura extraída de outro artigo (AVIVI; CHARI-BITRON, 1970).

Em relação aos antipsicóticos atípicos, um artigo recente demonstrou que o tratamento com olanzapina foi capaz de aumentar o tempo de permanência de peixes zebrafish adultos na parte superior do aquário (SEIBT et al., 2010). Além do LSD e antipsicóticos, outras moléculas parecem induzir comportamento de flotação em zebrafish adultos, como cetamina (RIEHL et al., 2011) e MK-801 (SEIBT et al., 2010), ambos antagonistas do receptor de NMDA. Isso parece ser um paradoxo: enquanto clozapina, olanzapina e risperidona possuem propriedades antipsicóticas, os alucinógenos LSD, cetamina e MK-801 são capazes de induzir surto psicótico. No entanto, não se sabe qual mecanismo é responsável para que tanto antipsicóticos quanto pró-psicóticos induzam o comportamento de flotação, nem se há uma ligação entre o mecanismo de ambos.

Uma das explicações para o comportamento de flotação induzido pelos antipsicóticos atípicos pode ser o descontrole da bexiga natatória. Como já descrito, a bexiga natatória no zebrafish se distingue por não apresentar estruturas que transferem gás do sangue para inflá-la (FINNEY et al., 2006). Assim, para inflar, o zebrafish precisa aspirar bolhas de ar pelo esôfago para então introduzi-lo na bexiga natatória através do duto pneumático (RIEGER; SUMMERFELT, 1998). Por outro lado, a deflação da bexiga envolve, ao mesmo tempo, a contração do músculo liso que a envolve a bexiga natatória com o relaxamento do esfíncter do duto pneumático (DUMBARTON et al., 2010; SMITH; CROLL, 2011). Portanto, sugere-se que o tratamento com antipsicóticos atípicos deva ter alterado alguns desses mecanismos. O tratamento, por exemplo, pode ter estimulado as larvas a aspirarem ar da superfície ou de bolhas dentro do tubo, o que fez inflar a bexiga natatória. Ao mesmo tempo, o mecanismo de deflação pode ter sido reduzido, impedindo as larvas de descenderem na coluna vertical. Dessa forma, vários fatores podem estar associados no desenvolvimento do comportamento de flotação.

O papel do sistema nervoso autônomo no controle da inflação e deflação não é muito bem conhecido no zebrafish. Sabe-se que há enervação colinérgica nos músculos do esfíncter do duto pneumático e noradrenérgica no músculo liso que envolve a bexiga (FINNEY et al., 2006). No caso do zebrafish, a deflação da bexiga se dá pela ativação de receptores beta-adrenérgicos (DUMBARTON et al., 2010). Como os antipsicóticos estudados não interagem com receptores beta-adrenérgicos, supõe-se que pelo menos a deflação da bexiga natatória não foi bloqueada. Além disso, o antagonismo muscarínico na região do esfíncter parece não ser importante para o comportamento de flotação visto que risperidona não interage com esses receptores. Sabe-se que neurônios positivos para serotonina, NPY e VIP também são encontrados na região da bexiga natatória. No caso de serotonina, há varicosidades ao longo da parede do duto pneumático e na artéria da bexiga natatória, o que pode contribuir para o controle neural do músculo liso do duto pneumático (FINNEY et al., 2006).

Assim, os receptores serotoninérgicos nessas regiões poderiam, hipoteticamente, ser modulados por clozapina e risperidona visto que esses antipsicóticos interagem com vários outros receptores de serotonina além do 5-HT<sub>2a</sub>. Entretanto, acredita-se que a modulação do comportamento de flotação pelos antipsicóticos atípicos ocorra através de circuitos desconhecidos no sistema nervoso central onde o bloqueio dos receptores D<sub>2</sub> e H<sub>1</sub>, e provavelmente de outros alvos, altera a atividade do sistema nervoso no controle da bexiga natatória.

Além da desregulação da bexiga natatória, o comportamento de flotação pode estar associado a efeitos sedativos. Dessa forma, foi desenvolvido um ensaio para avaliar o efeito dos fármacos sobre a atividade locomotora espontânea de larvas 7 dpf. No teste, foi avaliado quantas vezes cada larva cruzou linhas que estavam dispostas no fundo de cada poço da placa de 24 poços (Figura 18). Assim, o teste reflete o quanto cada larva deslocou, mas não indica diretamente se a velocidade ou se o número de movimentos foram alterados. Para avaliar a

atividade locomotora, foi utilizada a concentração que foi mais significativa no comportamento de flotação, para cada fármaco (Figura 29a).

A avaliação do deslocamento das larvas revelou uma enorme variação. Enquanto algumas larvas deslocaram o tempo todo, outras não movimentaram durante toda a avaliação. Portanto, foi decidido demonstrar a variação entre larvas através de um gráfico de dispersão, no qual pode ser observado como o tratamento parece afetar as larvas de forma heterogênea (Figura 29). O tratamento agudo com clozapina (5  $\mu\text{M}$ ), risperidona (10  $\mu\text{M}$ ) e mepiramina (10  $\mu\text{M}$ ) reduziram o número de vezes que as larvas cruzaram as linhas quando comparado com o veículo, como indicado pelo teste Mann-Whitney (clozapina:  $U = 22$ ,  $p < 0.0001$ ; risperidona:  $U = 85$ ,  $p < 0.0001$ ; mepiramina:  $U = 155.5$ ,  $p < 0.01$ ) (Figura 29a). Enquanto isso, o tratamento com haloperidol (2.4  $\mu\text{M}$ ) não foi capaz de alterar o número de cruzamentos de forma significativa quando comparado ao veículo, como indicado pelo teste-t não pareado ( $t_{46} = 1.245$ ,  $p = 0.22$ ) (Figura 29a).

Nota-se que o antipsicótico clozapina reduziu o deslocamento de maneira mais intensa que risperidona, e risperidona reduziu de maneira mais intensa que mepiramina. Dessa forma, a redução do número de deslocamentos parece correlacionar com o comportamento de flotação, provavelmente devido à sedação. Além disso, percebe-se que parte das larvas nos grupos mepiramina e risperidona não são afetadas pelo tratamento. Isso pode indicar apenas uma variação no desenvolvimento, pode estar relacionado à diferença genética entre as larvas.

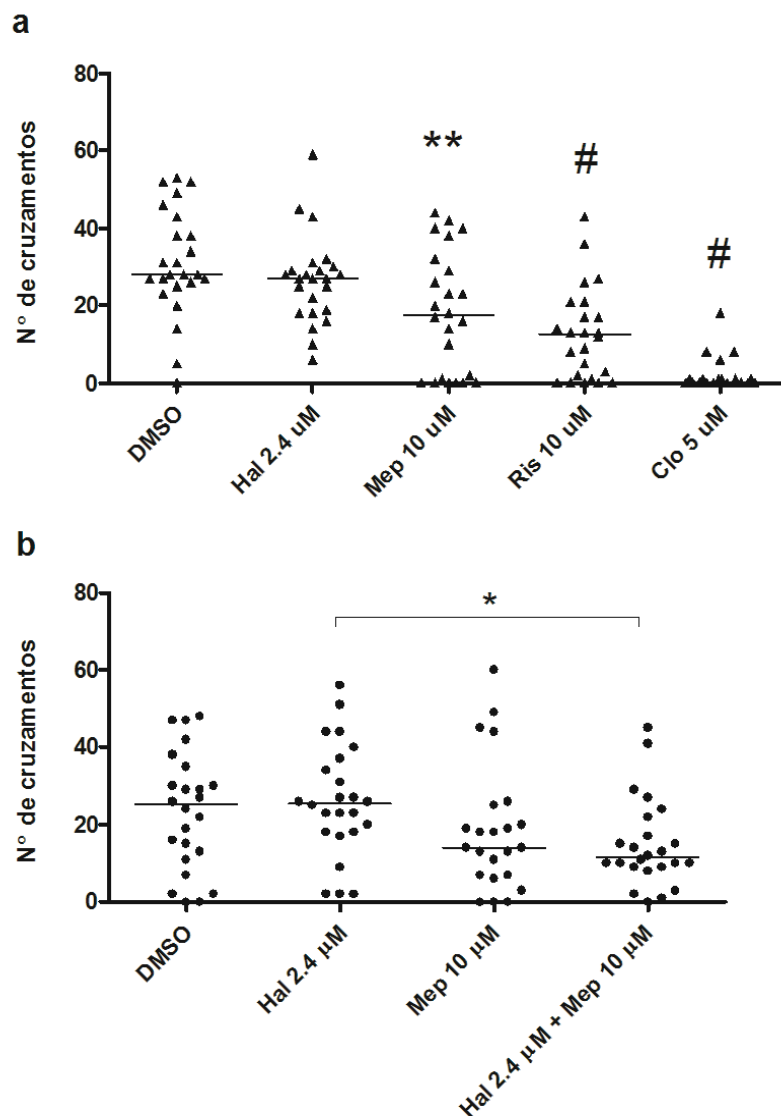
A redução do deslocamento de larvas de zebrafish já tinha sido demonstrada para clozapina (BOEHMLER et al., 2007) e para mepiramina (PEITSARO et al., 2007), embora em concentrações mais altas que as demonstradas por esta tese. Em relação a clozapina, a primeira concentração significativa que reduziu o deslocamento das larvas foi de 12.5  $\mu\text{M}$ . Essa discrepância não é devido à

diferente método, visto que tanto nesse artigo (BOEHMLER et al., 2007) como nesta tese a quantificação do deslocamento foi avaliada através do número de cruzamentos. Uma das razões dessa diferença pode estar vinculado à grande variabilidade genética entre linhagens de zebrafish. A variação genética entre indivíduos da mesma população chega a 7%, enquanto entre indivíduos selvagens chega a 37% (GURYEV et al., 2006). Dessa forma, a interpretação entre experimentos de grupos diferentes deve ser avaliada de forma cautelosa. Além disso, foi demonstrado que o agonismo do receptor D<sub>4</sub>, mas não o agonismo de D<sub>2</sub>, foi capaz de reverter parcialmente a redução do deslocamento causado pela clozapina (BOEHMLER et al., 2007). Esse resultado explica o dado que o haloperidol, através do antagonismo do receptor D<sub>2</sub>, não foi capaz de alterar o deslocamento de larvas.

No entanto, atividade locomotora parece ser composta por vários comportamentos discretos que são regulados por vias dopaminérgicas distintas. O primeiro artigo a avaliar o efeito do haloperidol na atividade locomotora relatou que esse antipsicótico foi capaz de reduzir a velocidade média de larvas na concentração de 9 µM após duas horas de tratamento, com algumas larvas apresentando movimentos erráticos (GIACOMINI et al., 2006). Em outro trabalho, foi demonstrado que o tratamento com haloperidol, na concentração de 30 µM, foi capaz de reduzir o número de movimentos realizados por larvas de 7 dpf, o qual foi compensado por uma maior velocidade a cada movimento iniciado (FARRELL et al., 2011). Nessa linha, um estudo recente demonstrou que o agonismo do receptor D<sub>2</sub> é capaz de reduzir significativamente a porcentagem de movimentos iniciados em larvas de zebrafish (SOUZA; ROMANO-SILVA; TROPEPE, 2011). Isso parece sugerir que o antagonismo e o agonismo de D<sub>2</sub> não é capaz de alterar o deslocamento total das larvas, mas sim a quantidade e a velocidade dos movimentos iniciados.

Portanto, a atividade locomotora pode ser dividida em vários módulos comportamentais que são representados pelo número de movimentos

realizados, velocidade, deslocamento total, velocidade de cada movimento e a porcentagem do tempo que a larva se desloca (FARRELL et al., 2011). Dessa forma, o método escolhido na avaliação da atividade locomotora irá influenciar na interpretação do resultado.



**Figura 29.** Avaliação do efeito de vários fármacos sobre a atividade locomotora de larvas. A atividade locomotora das larvas refere-se ao número de cruzamentos realizados por cada larva em três minutos de avaliação. Os dados estão demonstrados em gráficos de dispersão, com traço indicando a mediana. **a** – Teste de Mann-Whitney indica que o tratamento com clozapina (clo), risperidona (ris) e mepiramina (mep) reduziram significativamente o número cruzamentos quando comparado com o veículo (n = 24 larvas por grupo; clozapina: U = 22, p < 0.0001, indicado por #; risperidona: U = 85, p < 0.0001, indicado por #; mepiramina: U = 155.5, p < 0.01,



indicado por \*\*). **b** – Análise de Kruskal-Wallis indica que o tratamento combinado haloperidol-mepiramina reduziu significativamente o deslocamento de larvas quando comparado ao tratamento com haloperidol sozinho ( $n = 24$  larvas por grupo;  $H_3 = 9.735$ ,  $p < 0.05$ ; teste de Dunn: hal 2.4  $\mu\text{M}$  vs. hal 2.4  $\mu\text{M}$  + mep 10  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.05$ , indicado por \*).

Como demonstrado, o haloperidol combinado com mepiramina parece ter efeito aditivo no comportamento de flotação. Entretanto, é desconhecido se esse efeito está associado a uma redução da atividade locomotora das larvas. Dessa forma, foi avaliado o efeito combinado de ambos antagonistas na atividade locomotora de larvas com 7 dpf (Figura 29b). Aparentemente, o tratamento combinado de haloperidol (2.4  $\mu\text{M}$ ) mais mepiramina (10  $\mu\text{M}$ ) reduziu de forma significativa o deslocamento das larvas apenas quando comparado com o grupo tratado com haloperidol 2.4  $\mu\text{M}$  (Kruskal-Wallis;  $H_3 = 9.735$ ,  $p < 0.05$ ; teste de Dunn: hal 2.4  $\mu\text{M}$  vs. hal 2.4  $\mu\text{M}$  + mep 10  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.05$ ). A falta de significância entre o grupo controle e os demais grupos parece estar relacionada a uma menor atividade espontânea do grupo controle. Dessa forma, como as larvas já apresentavam uma baixa atividade, o tratamento não reproduziu o efeito verificado no experimento anterior (Figura 29a).

Sabe-se que a atividade locomotora das larvas é influenciada por vários fatores como a intensidade luminosa e o horário do dia (MACPHAIL et al., 2009), o que pode ter contribuído para a discrepância desse resultado. De qualquer forma, o tratamento combinado de haloperidol-mepiramina mostrou-se capaz de reduzir significativamente o deslocamento quando comparado a haloperidol sozinho, enquanto mepiramina sozinha não apresentou redução significativa quando comparado com haloperidol. Isso sugere que o bloqueio de receptores  $D_2$  e  $H_1$  produz um efeito aditivo tanto no comportamento de flotação quando na redução da atividade locomotora.

Enfim, os resultados acima demonstram que o comportamento de flotação, juntamente com a atividade locomotora espontânea podem ser utilizados na avaliação dos efeitos farmacológicos de antipsicóticos. Aparentemente, foi a

primeira vez que o comportamento de flotação foi induzido farmacologicamente em larvas de peixe. O uso de larvas apresenta uma grande vantagem em relação ao uso de adultos, principalmente porque as larvas desenvolvem em apenas sete dias enquanto os adultos precisam de três meses. Além disso, as larvas apresentam menor variabilidade comportamental, exigem menos manutenção, podem ser obtidas em grandes números. Todos esses fatores permitem utilizar as larvas em experimentos de grande escala, facilitando a descoberta e o estudo de fármacos.

#### **4.4 Clozapina inibe comportamento de agregação de cepas sociais de *C. elegans***

Além dos sintomas psicóticos, os pacientes esquizofrênicos apresentam vários sintomas negativos, como isolamento social e comportamento apático (VAN OS; KAPUR, 2009). Como normalmente roedores não apresentam sintomas negativos, esse fenótipo pode ser induzido com uso de antagonistas de NMDA (RUNG et al., 2005) ou através da produção de camundongos geneticamente modificados que apresentam redução da expressão de subunidades do receptor NMDA (MOHN et al., 1999). De qualquer forma, o desenvolvimento desses modelos é trabalhoso, não sendo possível avaliar vários fármacos de maneira sistemática. Portanto, faz-se necessário estabelecer modelos mais robustos que possam ser utilizados na descoberta de medicamentos de maneira mais produtiva. Assim, procurou-se encontrar um modelo simples mas que também apresentasse um comportamento social complexo.

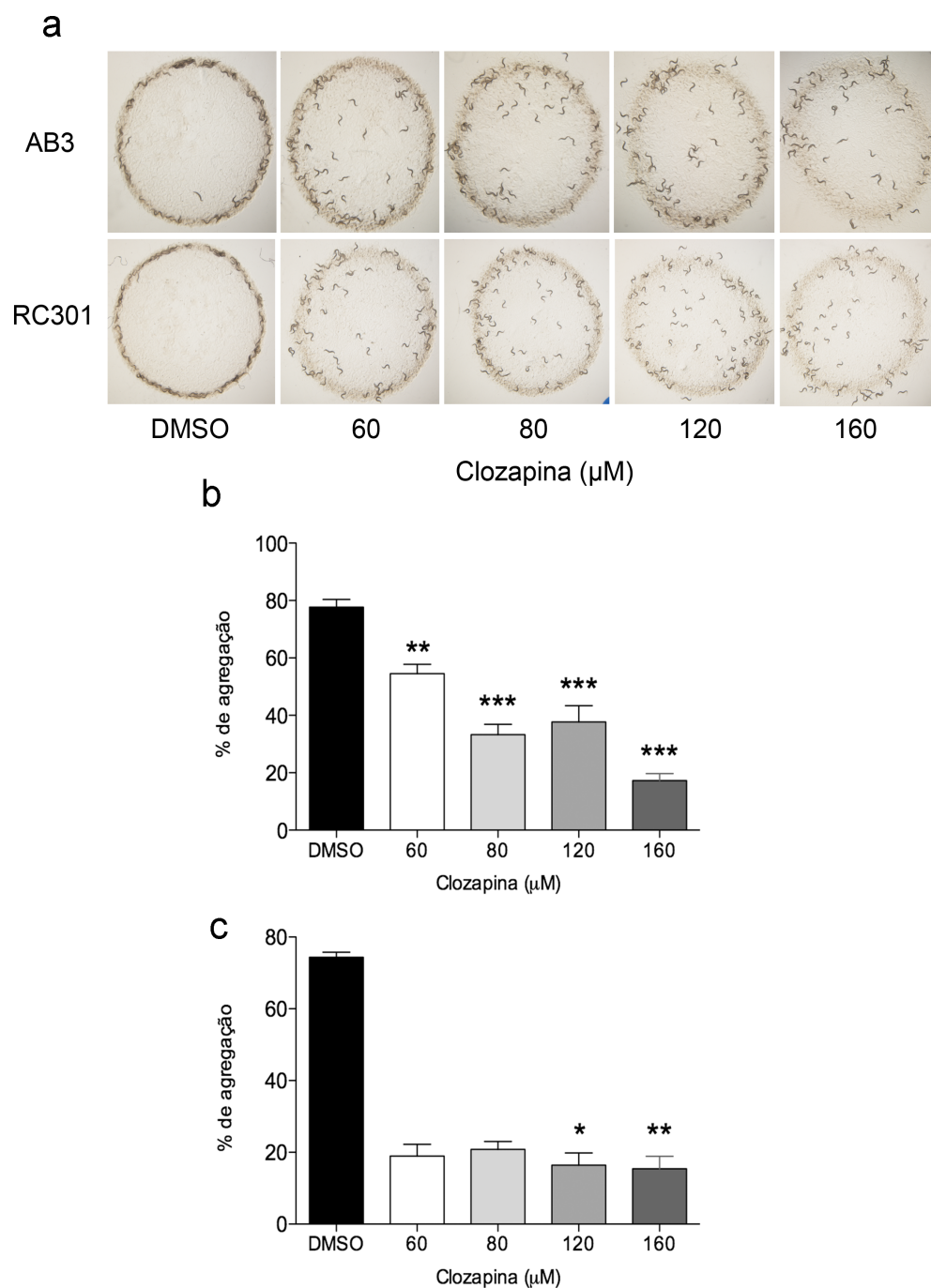
Dentre os vários modelos analisados na literatura, o comportamento social de algumas cepas de *C. elegans* demonstrou potencial para ser utilizado na avaliação farmacológica. Enquanto a cepa padrão N2 alimenta-se sozinha, as cepas sociais formam agregados na hora de alimentar (DE BONO; BARGMANN, 1998). Essa variação comportamental é determinada por uma mutação no gene NPR-1, homólogo do receptor NPY encontrado em mamíferos. Essas cepas

foram utilizadas apenas uma vez em estudo farmacológico, no qual foram avaliados os efeitos da mutação do NPR-1 na resposta comportamental ao etanol (DAVIES et al., 2004).

Portanto, procurou-se avaliar se o antipsicótico clozapina era capaz de alterar o comportamento de agregação das cepas sociais. Uma vez que as cepas sociais apresentam um fundo genético diferente, foram avaliadas duas cepas sociais distintas, AB3 e RC301, que apresentam a mesma mutação no gene NPR-1. Se ambas apresentassem o mesmo fenótipo após o tratamento, isso excluiria a influência de outros polimorfismos genéticos. A curva de concentração de clozapina foi baseada em outros estudos com *C. elegans* no qual foi demonstrado o efeito desse antipsicótico na modulação do batimento faríngeo (DONOHOE et al., 2008) e na estimulação da oviposição (KARMACHARYA et al., 2011).

Para induzir a agregação natural das cepas sociais, 80 vermes hermafroditas adultos foram transferidos para uma placa de ágar contendo camada circular de bactérias e as placas foram incubadas por duas horas (Figura 30a). Como pode ser observado no grupo DMSO (veículo) (Figura 30a), ambas as cepas apresentaram um intenso comportamento de agregação, com os nematódeos acumulando na borda da camada de bactérias. Esse comportamento social foi inibido após tratamento agudo com clozapina, com os nematódeos se alimentando de forma solitária (Figura 30a). Com o intuito de quantificar o comportamento de agregação, foi avaliada a porcentagem de vermes que estavam em contato com dois ou mais vermes. Em relação à cepa AB3 (Figura 30b), o tratamento com clozapina inibiu significativamente o comportamento de agregação de forma dependente da concentração, em todas as concentrações testadas quando comparado ao veículo (ANOVA de uma via;  $F_{4-25} = 38.71$ ,  $p < 0.0001$ ; teste de Bonferroni: DMSO vs. 60  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.01$ ; DMSO vs. 80, 120 e 160  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ ).

Enquanto isso, a cepa social RC301 apresentou grande variabilidade no comportamento de agregação após o tratamento com clozapina, o que fez com que os resultados não seguissem normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Dessa forma, através da análise de Kruskal-Wallis, apenas as concentrações de 120 e 160  $\mu\text{M}$  foram significativas quando comparadas ao veículo no teste post-hoc de Dunn ( $H_4 = 16$ ,  $p < 0.01$ ; teste de Dunn: DMSO vs. 120,  $p < 0.05$ ; DMSO vs. 160,  $p < 0.01$ ) (Figura 30b). No entanto, percebe-se que nas concentrações de 60 e 80  $\mu\text{M}$  há uma forte tendência à significância, que poderia ser obtida apenas aumentando o número amostral.



**Figura 30.** Clozapina inibe comportamento de agregação em cepas sociais de *C. elegans*. Foram transferidos 80 vermes hermafroditas adultos para placas de ágar contendo camada de bactérias. As placas foram pré-equilibradas com concentrações crescentes de clozapina ou DMSO um dia antes. O efeito do fármaco no comportamento de agregação foi avaliado duas horas após a transferência dos vermes. **a** - Figuras representativas da curva de concentração de clozapina sobre o comportamento de agregação das cepas sociais AB3 e RC301. **b e c** – comportamento de agregação foi quantificado ao definir a porcentagem de vermes que estavam

em contato com dois ou mais vermes, num total de 80. **b** – Quantificação do efeito de clozapina sobre o comportamento de agregação da cepa AB3. Exposição à clozapina inibiu significativamente o comportamento de agregação de forma dependente da concentração, quando comparado ao veículo, para todas concentrações avaliadas (ANOVA de uma via,  $p < 0.0001$ ; teste de Bonferroni: DMSO vs. 60  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.01$ , indicado por \*\*; DMSO vs. 80, 120 e 160  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.001$ , indicado por \*\*\*). **c** - Quantificação do efeito de clozapina sobre o comportamento de agregação da cepa RC301. Clozapina inibiu significativamente o comportamento de agregação apenas nas concentrações de 120 e 160  $\mu\text{M}$  de clozapina quando comparado ao veículo (Kruskal-Wallis,  $p < 0.01$ ; teste de Dunn: DMSO vs. 120,  $p < 0.05$ , indicado por \*; DMSO vs. 160,  $p < 0.01$ , indicado por \*\*).

Alguns estudos demonstraram a capacidade de diferentes antipsicóticos em alterar o comportamento do *C. elegans*. Tanto antipsicóticos típicos e atípicos mostraram ser capazes de modular o batimento faríngeo e, por consequência, o comportamento alimentar do verme (DONOHOE et al., 2008). Em outro estudo, foi demonstrado que a clozapina promove a oviposição e este efeito é mediado por receptor de amins não convencionais (KARMACHARYA et al., 2011). Além disso, clozapina, em concentrações elevadas, induz a suspensão do desenvolvimento larval aparentemente através da via de sinalização mediada por fostatidilinositol-3-quinase/insulina (KARMACHARYA et al., 2009). Em um estudo recente, foi demonstrado que a inibição do desenvolvimento por clozapina é mediada através do agonismo do receptor ACR-7, homólogo do receptor nicotínico tipo alfa (SAUR et al., 2013). Em vários desses estudos, outros antipsicóticos, tanto típicos como atípicos, não puderam repetir os efeitos da clozapina, indicando um mecanismo de ação distinto dos outros fármacos.

Como já descrito, sabe-se que o NPR-1 selvagem é ativado por dois ligantes, o FLP-21 e FLP-18, que não apresentam homologia com o peptídeo NPY (ROGERS et al., 2003). No caso das cepas sociais, apenas o FLP-21 é capaz de ativar o NPR-1 mutante, embora de maneira menos eficiente. De forma interessante, o comportamento de cepas sociais pôde ser revertido quando a

expressão de FLP-21 foi aumentada geneticamente, indicando a possibilidade de reversão do fenótipo social (Rogers et al., 2003).

Portanto, sugere-se como hipótese que o tratamento com clozapina foi capaz de aumentar a expressão do ligante FLP-21, o que levou a redução do comportamento de agregação. Em linha com essa tese, sabe-se que alguns antipsicóticos são capazes de modular áreas hipotalâmicas onde se localizam neurônios produtores de NPY, os quais são responsáveis por controlar o comportamento alimentar e metabolismo energético (KIM et al., 2007). Além disso, já foi demonstrado que clozapina, mas não haloperidol, aumenta a expressão de NPY no hipotálamo de ratos (KIRK et al., 2009). Essas evidências apontam a hipótese de que a clozapina é capaz de alterar o comportamento de agregação das cepas sociais ao aumentar a expressão de FLP-21. Uma maior expressão desse ligante compensaria a menor atividade do NPR-1 mutante, o que inibiria a agregação.

Uma outra possibilidade é que o antagonismo de receptores de dopamina e serotonina impede os nematódeos de detectarem a presença de bactérias. Sabe-se que o comportamento de agregação somente é induzido na presença de comida (DE BONO; BARGMANN, 1998), o que indica que sinais provenientes das bactérias são capazes de induzir o comportamento de agregação. Nessa linha, sabe-se que a dopamina está envolvida na detecção de comida nos nematódeos (KINDT et al., 2007; SAWIN; RANGANATHAN; HORVITZ, 2000). Existem oito neurônios dopaminérgicos em hermafroditas de *C. elegans* que possuem terminações sensoriais expostas para o ambiente externo, as quais detectam textura de partículas pequenas, como bactérias (SAWIN; RANGANATHAN; HORVITZ, 2000). A estimulação desses neurônios leva a liberação de dopamina endógena que faz com que o animal reduza a locomoção. Assim, pode-se pensar que o bloqueio dopaminérgico faz com que as cepas sociais não detectem eficientemente a camada de bactéria, o que não induz os vermes a reduzirem a locomoção para iniciar o comportamento de

agregação. Por outro lado, sabe-se que a via serotoninérgica é necessária para que o animal reduza a velocidade ao encontrar comida (SAWIN; RANGANATHAN; HORVITZ, 2000), com um efeito muito mais intenso do que o mediado pela dopamina. Assim, o antagonismo associado dos receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos pode ser um dos mecanismos pelo qual o comportamento de agregação foi inibido pela clozapina.

As vantagens de se utilizar o nematódeo *C. elegans* se devem à possibilidade de combinar ferramentas farmacológicas com o uso de vermes mutantes e transgênicos. A junção dessas duas abordagens permite decifrar as vias moleculares de maneira mais sistemática. Portanto, os resultados demonstram a viabilidade de usar o modelo de comportamento social utilizando cepas de *C. elegans* para avaliar o efeito de antipsicóticos. O método desenvolvido não necessita de estrutura laboratorial complexa o que facilita a implementação do método. Além disso, esse teste provavelmente não se restringe à antipsicóticos, logo outros fármacos poderiam ser avaliados.

## 5 Conclusão

O campo de estudo da farmacologia sempre utilizou os animais como meio de estudar os efeitos fisiológicos dos medicamentos. Entretanto, devido a pressão para desenvolver novos medicamentos e pela introdução das ferramentas de biologia molecular, a abordagem farmacológica migrou do estudo de fármacos através de fenótipos para uma abordagem focada no alvo, utilizando sistemas *in vitro*. Porém, o desenvolvimento de fármacos psiquiátricos depende inteiramente da complexidade do sistema *in vivo*, o que dificulta o desenvolvimento e o estudo de fármacos *in vitro*. Assim, recentemente, tem-se procurado desenvolver novas metodologias que combinem as vantagens já conhecidas dos estudos *in vivo* com o potencial de realizar experimentos em grande escala. Dessa forma, modelos animais alternativos como o zebrafish e o *C. elegans*



preenchem esses requisitos e, portanto, surge a necessidade de estabelecer fenótipos observáveis para esses estudos.

No caso do zebrafish, demonstramos a utilidade de usar distintos comportamentos da larva para avaliar o efeito de antipsicóticos. Enquanto a análise do comportamento de flotação e o de dispersão de melanóforos ainda é feita manualmente, já é possível avaliar a atividade locomotora de centenas de larvas ao mesmo tempo utilizando sistema automatizado (KOKEL et al., 2010; RIHEL et al., 2010; WOLMAN et al., 2011). Isso indica que o zebrafish tem o potencial de ser utilizado em 'screenings' farmacêuticos para acelerar a descoberta de novos medicamentos. A vantagem de se utilizar larvas no lugar de peixes adultos é clara, e é o que torna competitivo o zebrafish em comparação aos modelos que utilizam os roedores.

Enfim, pode-se indicar que os comportamentos de flotação, dispersão de melanóforos e atividade locomotora foram sensíveis para avaliar o efeito dos antipsicóticos. Em especial, o comportamento de flotação parece ser mediado pelo antagonismo do receptor histaminérgico  $H_1$  e dopaminérgico  $D_2$ , enquanto o antagonismo do receptor serotoninérgico  $5-HT_{2a}$  não altera esse comportamento. Portanto, os resultados indicam que o comportamento de flotação e os outros comportamentos avaliados podem ser utilizados na avaliação farmacológica de antipsicóticos.

Enquanto isso, a mobilização do vitelo não foi sensível aos antipsicóticos atípicos clozapina e olanzapina, somente a agonismo dopaminérgico. Logo, a mobilização de vitelo não é indicada para avaliar os efeitos metabólicos causado por antipsicóticos atípicos.

Em relação ao modelo de comportamento social utilizando cepas mutantes de *C. elegans*, verificou-se que a clozapina foi capaz de inibir o comportamento de agregação das cepas AB3 e RC301. Isso indica a sensibilidade do

comportamento ante ao tratamento com clozapina. Uma vez que o comportamento de agregação é facilmente analisado por microscopia ótica, esse método permite avaliar o mecanismo de ação de fármacos sem depender de técnicas avançadas. As vantagens do *C. elegans* em relação ao zebrafish se devem à grande oferta de mutantes com vários fenótipos comportamentais e ao sistema nervoso mais simples, com um número definido de neurônios. Por outro lado, o zebrafish, por ser vertebrado, está mais perto filogeneticamente dos mamíferos que o nematódeo, apresentando maior homologia tanto genética como morfológica.

O campo da farmacologia precisa de várias estratégias para estudar os fármacos, sem que nenhuma exclua a outra. Dessa forma, o desenvolvimento de modelos animais alternativos auxilia outras abordagens na difícil tarefa de desenvolver fármacos inovadores, como também ajuda no entendimento dos mecanismos de ação dos fármacos já existentes. Assim, espera-se que as metodologias desenvolvidas e aprimoradas nesta tese possam ser úteis futuramente.

## 6 Referências

ABRAMSON, H. A.; EVANS, L. T. Lysergic Acid Diethylamide (LSD 25): II. Psychobiological Effects on the Siamese Fighting Fish. **Science**, v. 120, n. 3128, p. 990–991, 10 dez. 1954.

ADER, M. et al. Metabolic Dysregulation With Atypical Antipsychotics Occurs in the Absence of Underlying Disease A Placebo-Controlled Study of Olanzapine and Risperidone in Dogs. **Diabetes**, v. 54, n. 3, p. 862–871, 1 mar. 2005.

AIRHART, M. J. et al. Adverse effects of serotonin depletion in developing zebrafish. **Neurotoxicology and teratology**, v. 34, n. 1, p. 152–60, 2012.

ALBAUGH, V. L. et al. Olanzapine promotes fat accumulation in male rats by decreasing physical activity, repartitioning energy and increasing adipose tissue lipogenesis while impairing lipolysis. **Molecular psychiatry**, v. 16, n. 5, p. 569–81, maio. 2011.

ALEXANDER, J. et al. Rapid tranquillisation of violent or agitated patients in a psychiatric emergency setting: Pragmatic randomised trial of intramuscular lorazepam v. haloperidol plus promethazine. **The British Journal of Psychiatry**, v. 185, n. 1, p. 63–69, 1 jul. 2004.

ALLISON, D. B. et al. Antipsychotic-induced weight gain: a comprehensive research synthesis. **The American journal of psychiatry**, v. 156, n. 11, p. 1686–96, nov. 1999.

ALTUN, Z. F.; HALL, D. H. **Introduction**. In **WormAtlas**. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.

AMANO, M.; TAKAHASHI, A. Melanin-concentrating hormone: A neuropeptide hormone affecting the relationship between photic environment and fish with special reference to background color and food intake regulation. **Peptides**, v. 30, n. 11, p. 1979–1984, nov. 2009.

ANGST, J. et al. Ergebnisse eines Doppelblindversuches von HF 1854 \* (8-Chlor-11-(4-methyl-1-piperazinyl)-5H-dibenzo (b, e) (1,4) diazepin) im Vergleich zu Levomepromazin. **Pharmacopsychiatry**, v. 4, n. 04, p. 192–200, 21 jan. 2009.

APPELBAUM, L. et al. Sleep-wake regulation and hypocretin-melatonin interaction in zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 51, p. 21942–7, 22 dez. 2009.

AVIVI, A.; CHARI-BITRON, A. Estimation of low chlorpromazine concentrations by surfacing and sinking reaction of minnows (*Gambusia affinis*).

**Psychopharmacologia**, v. 18, n. 4, p. 407–11, jan. 1970.

AYD, F. J. A Survey of Drug-Induced Extrapyramidal Reactions. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 175, n. 12, p. 1054, 25 mar. 1961.

BAKER, B. I.; WILSON, J. F.; BOWLEY, T. J. Changes in pituitary and plasma levels of MSH in teleosts during physiological colour change. **General and comparative endocrinology**, v. 55, n. 1, p. 142–9, jul. 1984.

BAKKER, R. A. et al. In vitro pharmacology of clinically used central nervous system-active drugs as inverse H(1) receptor agonists. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 322, n. 1, p. 172–9, jul. 2007.

BAKSHI, V.; SWERDLOW, N.; GEYER, M. Clozapine antagonizes phencyclidine-induced deficits in sensorimotor gating of the startle response. **Journal of Pharmacology and ...**, v. 271, n. 2, p. 787–794, 1994.

BAN, T. Fifty years chlorpromazine: a historical perspective. **Neuropsychiatric disease and treatment**, v. 3, n. 4, p. 495–500, 2007.

BARABAN, S. C. et al. A large-scale mutagenesis screen to identify seizure-resistant zebrafish. **Epilepsia**, v. 48, n. 6, p. 1151–7, jun. 2007.

BARRETT, J. E. Antipsychotic drug effects on the behavior of squirrel monkeys differentially controlled by noxious stimuli. **Psychopharmacology**, v. 77, n. 1, p. 1–6, maio. 1982.

BEAULIEU, J.; GAINETDINOV, R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. **Pharmacological reviews**, v. 63, n. 1, p. 182–217, 2011.

BEAULIEU, J.-M. et al. An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. **Cell**, v. 122, n. 2, p. 261–73, 29 jul. 2005.

BEAULIEU, J.-M.; GAINETDINOV, R. R.; CARON, M. G. Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 49, p. 327–47, jan. 2009.

BENES, F. M.; BERRETTA, S. GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder.

**Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 1–27, jul. 2001.

BERMAN, J. R. et al. Characterization of two melanin-concentrating hormone genes in zebrafish reveals evolutionary and physiological links with the mammalian MCH system. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 517, n. 5, p. 695–710, 10 dez. 2009.

BERTON, O.; NESTLER, E. J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 137–51, fev. 2006.

BIRKENAES, A. B. et al. Dyslipidemia independent of body mass in antipsychotic-treated patients under real-life conditions. **Journal of clinical psychopharmacology**, v. 28, n. 2, p. 132–7, abr. 2008.

BLOUIN, M. et al. Adiposity and eating behaviors in patients under second generation antipsychotics. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 16, n. 8, p. 1780–7, ago. 2008.

BOEHMLER, W. et al. Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 230, n. 3, p. 481–93, jul. 2004.

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. 155–66, mar. 2007.

BREIER, A et al. Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 6, p. 2569–74, 18 mar. 1997.

BREIER, A. et al. A double-blind, placebo-controlled dose-response comparison of intramuscular olanzapine and haloperidol in the treatment of acute agitation in schizophrenia. **Archives of general psychiatry**, v. 59, n. 5, p. 441–8, maio. 2002.

BROWN, R. E.; STEVENS, D. R.; HAAS, H. L. The physiology of brain histamine. **Progress in neurobiology**, v. 63, n. 6, p. 637–72, abr. 2001.

BURGESS, H. A; GRANATO, M. Sensorimotor gating in larval zebrafish. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 18, p. 4984–94, 2 maio. 2007.

- BURNE, T. et al. Big ideas for small brains: what can psychiatry learn from worms, flies, bees and fish? **Molecular psychiatry**, v. 16, n. 1, p. 7–16, jan. 2011.
- BURRILL, J. D.; EASTER, S. S. Development of the retinofugal projections in the embryonic and larval zebrafish (*Brachydanio rerio*). **The Journal of comparative neurology**, v. 346, n. 4, p. 583–600, 22 ago. 1994.
- BUTCHER, E. C.; BERG, E. L.; KUNKEL, E. J. Systems biology in drug discovery. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 10, p. 1253–9, out. 2004.
- CARLSSON, A.; LINDQVIST, M. Effect of Chlorpromazine or Haloperidol on Formation of 3-Methoxytyramine and Normetanephrine in Mouse Brain. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**, v. 20, n. 2, p. 140–144, 13 mar. 1963.
- CARTEN, J. D.; FARBER, S. A. A new model system swims into focus: using the zebrafish to visualize intestinal metabolism in vivo. **Clinical lipidology**, v. 4, n. 4, p. 501–515, 1 ago. 2009.
- CHINTOH, A. F. et al. Insulin resistance and decreased glucose-stimulated insulin secretion after acute olanzapine administration. **Journal of clinical psychopharmacology**, v. 28, n. 5, p. 494–9, out. 2008.
- CHINTOH, A. F. et al. Insulin resistance and secretion in vivo: effects of different antipsychotics in an animal model. **Schizophrenia research**, v. 108, n. 1-3, p. 127–33, mar. 2009.
- COATES, J. C.; DE BONO, M. Antagonistic pathways in neurons exposed to body fluid regulate social feeding in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 419, n. 6910, p. 925–9, 31 out. 2002.
- COCCURELLO, R. et al. Chronic administration of olanzapine induces metabolic and food intake alterations: a mouse model of the atypical antipsychotic-associated adverse effects. **Psychopharmacology**, v. 186, n. 4, p. 561–71, jul. 2006.
- COPE, M. B. et al. Risperidone alters food intake, core body temperature, and locomotor activity in mice. **Physiology & behavior**, v. 96, n. 3, p. 457–63, 2 mar. 2009.
- CORBETT, R. et al. Effects of atypical antipsychotic agents on social behavior in rodents. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 45, n. 1, p. 9–17, maio. 1993.
- CORRELL, C. U. et al. Cardiometabolic risk of second-generation antipsychotic medications during first-time use in children and adolescents. **JAMA : the**

**journal of the American Medical Association**, v. 302, n. 16, p. 1765–73, 28 out. 2009.

CORRELL, C. U.; LENGZ, T.; MALHOTRA, A. K. Antipsychotic drugs and obesity. **Trends in molecular medicine**, v. 17, n. 2, p. 97–107, fev. 2011.

CRANE, G. E. Tardive dyskinesia in patients treated with major neuroleptics: a review of the literature. **The American journal of psychiatry**, v. 124, n. 8, p. Suppl:40–8, fev. 1968.

CREESE, I.; BURT, D.; SNYDER, S. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. **Science**, v. 192, n. 4238, p. 481–483, 1976.

CURRAN, C.; BYRAPPA, N.; MCBRIDE, A. Stimulant psychosis: systematic review. **The British journal of psychiatry : the journal of mental science**, v. 185, p. 196–204, set. 2004.

CUTTING, W. et al. The use of fish in the evaluation of drugs affecting the central nervous system. **Journal of clinical and experimental psychopathology**, v. 20, n. 1, p. 26–32, 1959.

DAVIES, A. G. et al. Natural variation in the npr-1 gene modifies ethanol responses of wild strains of *C. elegans*. **Neuron**, v. 42, n. 5, p. 731–43, 10 jun. 2004.

DAVOODI, N. et al. Hyperphagia and increased meal size are responsible for weight gain in rats treated sub-chronically with olanzapine. **Psychopharmacology**, v. 203, n. 4, p. 693–702, maio. 2009.

DE BONO, M. et al. Social feeding in *Caenorhabditis elegans* is induced by neurons that detect aversive stimuli. **Nature**, v. 419, n. 6910, p. 899–903, 31 out. 2002.

DE BONO, M.; BARGMANN, C. I. Natural Variation in a Neuropeptide Y Receptor Homolog Modifies Social Behavior and Food Response in *C. elegans*. **Cell**, v. 94, n. 5, p. 679–689, set. 1998.

DE BONO, M.; BARGMANN, C. I. Natural variation in a neuropeptide Y receptor homolog modifies social behavior and food response in *C. elegans*. **Cell**, v. 94, n. 5, p. 679–89, 4 set. 1998.

DE BONO, M.; MARICQ, A. V. Neuronal substrates of complex behaviors in *C. elegans*. **Annual review of neuroscience**, v. 28, p. 451–501, jan. 2005.

- DONOHOE, D. R. et al. Antipsychotic drugs disrupt normal development in *Caenorhabditis elegans* via additional mechanisms besides dopamine and serotonin receptors. **Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 54, n. 5, p. 361–72, nov. 2006.
- DONOHOE, D. R. et al. Antipsychotic drugs up-regulate tryptophan hydroxylase in ADF neurons of *Caenorhabditis elegans*: role of calcium-calmodulin-dependent protein kinase II and transient receptor potential vanilloid channel. **Journal of neuroscience research**, v. 86, n. 11, p. 2553–63, 15 ago. 2008.
- DULCIS, D.; SPITZER, N. C. Illumination controls differentiation of dopamine neurons regulating behaviour. **Nature**, v. 456, n. 7219, p. 195–201, 13 nov. 2008.
- DUMBARTON, T. C. et al. Adrenergic control of swimbladder deflation in the zebrafish (*Danio rerio*). **The Journal of experimental biology**, v. 213, n. Pt 14, p. 2536–46, 15 jul. 2010.
- EATON, W. W. et al. The burden of mental disorders. **Epidemiologic reviews**, v. 30, p. 1–14, jan. 2008.
- EGAN, C. T.; HERRICK-DAVIS, K.; TEITLER, M. Creation of a constitutively activated state of the 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor by site-directed mutagenesis: inverse agonist activity of antipsychotic drugs. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 286, n. 1, p. 85–90, jul. 1998.
- ENGL, J. et al. Olanzapine impairs glycogen synthesis and insulin signaling in L6 skeletal muscle cells. **Molecular psychiatry**, v. 10, n. 12, p. 1089–96, dez. 2005.
- ERLENMEYER-KIMLING, L. et al. Attention, memory, and motor skills as childhood predictors of schizophrenia-related psychoses: the New York High-Risk Project. **American Journal of ...**, v. 157, n. September, p. 1416–1422, 2000.
- FARBER, N. The NMDA receptor hypofunction model of psychosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 6, p. 119–130, 2003.
- FARRELL, T. C. et al. Evaluation of spontaneous propulsive movement as a screening tool to detect rescue of Parkinsonism phenotypes in zebrafish models. **Neurobiology of disease**, v. 44, n. 1, p. 9–18, out. 2011.
- FELL, M. J. et al. The distinct effects of subchronic antipsychotic drug treatment on macronutrient selection, body weight, adiposity, and metabolism in female rats. **Psychopharmacology**, v. 194, n. 2, p. 221–31, out. 2007.



- FIENBERG, A. A. DARPP-32: Regulator of the Efficacy of Dopaminergic Neurotransmission. **Science**, v. 281, n. 5378, p. 838–842, 7 ago. 1998.
- FINNEY, J. L. et al. Structure and autonomic innervation of the swim bladder in the zebrafish (*Danio rerio*). **The Journal of comparative neurology**, v. 495, n. 5, p. 587–606, 10 abr. 2006.
- FLEISCH, V.; NEUHAUSS, S. Visual Behavior in Zebrafish. **Zebrafish**, v. 3, n. 2, p. 1–11, 2006.
- FLYNN, E. J.; TRENT, C. M.; RAWLS, J. F. Ontogeny and nutritional control of adipogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of lipid research**, v. 50, n. 8, p. 1641–52, ago. 2009.
- FREEDMAN, R. Schizophrenia. **The New England journal of medicine**, v. 349, n. 18, p. 1738–49, 30 out. 2003.
- FUJII, R. The Regulation of Motile Activity in Fish Chromatophores. **Pigment Cell Research**, v. 13, n. 5, p. 300–319, out. 2000.
- GAHTAN, E.; TANGER, P.; BAIER, H. Visual prey capture in larval zebrafish is controlled by identified reticulospinal neurons downstream of the tectum. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 40, p. 9294–303, 5 out. 2005.
- GEYER, M. A; VOLLENWEIDER, F. X. Serotonin research: contributions to understanding psychoses. **Trends in pharmacological sciences**, v. 29, n. 9, p. 445–53, set. 2008.
- GEYER, M.; ELLENBROEK, B. Animal behavior models of the mechanisms underlying antipsychotic atypicality. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 27, p. 1071–1079, 2003.
- GIACOMINI, N. J. et al. Antipsychotics produce locomotor impairment in larval zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 28, n. 2, p. 245–250, mar. 2006.
- GISKES, K. et al. A systematic review of environmental factors and obesogenic dietary intakes among adults: are we getting closer to understanding obesogenic environments? **Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 12, n. 5, p. e95–e106, maio. 2011.
- GOLDSMITH, P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. **Current opinion in pharmacology**, v. 4, n. 5, p. 504–12, out. 2004.

- GOOLISH, E. M.; OKUTAKE, K. Lack of gas bladder inflation by the larvae of zebrafish in the absence of an air-water interface. **Journal of Fish Biology**, v. 55, n. 5, p. 1054–1063, nov. 1999.
- GOTHELF, D. et al. Weight gain associated with increased food intake and low habitual activity levels in male adolescent schizophrenic inpatients treated with olanzapine. **American Journal of Psychiatry**, v. 159, n. 6, p. 1055–1057, 1 jun. 2002.
- GRANATO, M.; NÜSSLEIN-VOLHARD, C. Fishing for genes controlling development. **Current opinion in genetics & development**, v. 6, n. 4, p. 461–8, ago. 1996.
- GRAY, J. M. et al. Oxygen sensation and social feeding mediated by a *C. elegans* guanylate cyclase homologue. **Nature**, v. 430, n. 6997, p. 317–22, 15 jul. 2004.
- GREENSPAN, P.; MAYER, E. P.; FOWLER, S. D. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. **The Journal of cell biology**, v. 100, n. 3, p. 965–73, mar. 1985.
- GROSSMAN, L. et al. Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. **Behavioural brain research**, v. 214, n. 2, p. 277–84, 25 dez. 2010.
- GRÜNDER, G.; HIPPIUS, H.; CARLSSON, A. The “atypicality” of antipsychotics: a concept re-examined and re-defined. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 8, n. 3, p. 197–202, mar. 2009.
- GRUNWALD, D. J.; EISEN, J. S. Headwaters of the zebrafish -- emergence of a new model vertebrate. **Nature reviews. Genetics**, v. 3, n. 9, p. 717–24, set. 2002.
- GURYEV, V. et al. Genetic variation in the zebrafish. **Genome research**, v. 16, n. 4, p. 491–7, abr. 2006.
- HALLARE, A. et al. Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 63, n. 3, p. 378–88, mar. 2006.
- HARTFIELD, A. W.; MOORE, N. A; CLIFTON, P. G. Effects of clozapine, olanzapine and haloperidol on the microstructure of ingestive behaviour in the rat. **Psychopharmacology**, v. 167, n. 2, p. 115–22, maio. 2003.
- HIGASHIJIMA, S.-I.; MANDEL, G.; FETCHO, J. R. Distribution of prospective glutamatergic, glycinergic, and GABAergic neurons in embryonic and larval

zebrafish. **The Journal of comparative neurology**, v. 480, n. 1, p. 1–18, 29 nov. 2004.

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

HILLEBRAND, J. J. G. et al. Olanzapine Reduces Physical Activity in Rats Exposed to Activity-Based Anorexia : Possible Implications for Treatment of Anorexia Nervosa ? 2005.

HIPPIUS, H. The history of clozapine. **Psychopharmacology**, p. 99–101, 1989.

HOLZSCHUH, J. et al. Dopamine transporter expression distinguishes dopaminergic neurons from other catecholaminergic neurons in the developing zebrafish embryo. **Mechanisms of development**, v. 101, p. 237–243, 2001.

HOPPMANN, V. et al. Expression of the eight AMPA receptor subunit genes in the developing central nervous system and sensory organs of zebrafish. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 237, n. 3, p. 788–99, mar. 2008.

HORST, W. D.; PRESKORN, S. H. Mechanisms of action and clinical characteristics of three atypical antidepressants: venlafaxine, nefazodone, bupropion. **Journal of Affective Disorders**, v. 51, n. 3, p. 237–254, dez. 1998.

HOUSEKNECHT, K. L. et al. Acute effects of atypical antipsychotics on whole-body insulin resistance in rats: implications for adverse metabolic effects. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 2, p. 289–97, fev. 2007.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 25 abr. 2013.

HUF, G. et al. Current practices in managing acutely disturbed patients at three hospitals in Rio de Janeiro-Brazil: a prevalence study. **BMC psychiatry**, v. 2, p. 4, jan. 2002.

HUF, G.; COUTINHO, E. S. F.; ADAMS, C. E. Rapid tranquillisation in psychiatric emergency settings in Brazil: pragmatic randomised controlled trial of intramuscular haloperidol versus intramuscular haloperidol plus promethazine. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 335, n. 7625, p. 869, 27 out. 2007.

IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ, J. et al. Agranulocytosis during treatment with clozapine. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 3, p. 193–198, 1977.

ITO, H.; YAMAMOTO, N. Non-laminar cerebral cortex in teleost fishes? **Biology letters**, v. 5, n. 1, p. 117–21, 23 fev. 2009.

JANSSEN, P. et al. Chemistry and Pharmacology of CNS Depressants Related to 4-(4-Hydroxy-4-phenylpiperidino) butyrophenone Part I--Synthesis and screening data in mice. **Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**, v. 1, n. 3, p. 281–297, 1959.

JOHNSON, D. E. et al. Inhibitory Effects of Antipsychotics on Carbachol-Enhanced Insulin Secretion From Perfused Rat Islets: Role of Muscarinic Antagonism in Antipsychotic-Induced Diabetes and Hyperglycemia. **Diabetes**, v. 54, n. 5, p. 1552–1558, 1 maio. 2005.

JONES, K. S. et al. A high throughput live transparent animal bioassay to identify non-toxic small molecules or genes that regulate vertebrate fat metabolism for obesity drug development. **Nutrition & metabolism**, v. 5, p. 23, jan. 2008.

KALUEFF, A. V et al. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 70–86, mar. 2013.

KANE, J. et al. Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic: a double-blind comparison with chlorpromazine. **Archives of General ...**, v. 45, n. 9, p. 789–796, 1 set. 1988.

KAPUR, S. Psychosis as a State of Aberrant Salience : A Framework Linking Biology, Phenomenology and Pharmacology in Schizophrenia. **American Journal of Psychiatry**, v. 160, p. 13–23, 2003.

KAPUR, S.; REMINGTON, G. Dopamine D2 receptors and their role in atypical antipsychotic action: still necessary and may even be sufficient. **Biological psychiatry**, v. 3223, n. 01, p. 873–883, 2001.

KAPUR, S.; SEEMAN, P. Does Fast Dissociation From the Dopamine D2 Receptor Explain the Action of Atypical Antipsychotics?: A New Hypothesis. **American Journal of Psychiatry**, v. 158, n. 3, p. 360–369, 1 mar. 2001.

KAPUR, S.; ZIPURSKY, R. B.; REMINGTON, G. Clinical and theoretical implications of 5-HT<sub>2</sub> and D2 receptor occupancy of clozapine, risperidone, and olanzapine in schizophrenia. **American Journal of Psychiatry**, v. 156, n. 2, p. 286–293, 1999.

KARMACHARYA, R. et al. Clozapine interaction with phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K)/insulin-signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 34, n. 8, p. 1968–78, jul. 2009.

KARMACHARYA, R. et al. Behavioral effects of clozapine: involvement of trace amine pathways in *C. elegans* and *M. musculus*. **Brain research**, v. 1393, p. 91–9, 1 jun. 2011.

KASLIN, J.; PANULA, P. Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). **The Journal of comparative neurology**, v. 440, n. 4, p. 342–77, 26 nov. 2001.

KASTENHUBER, E. et al. Genetic dissection of dopaminergic and noradrenergic contributions to catecholaminergic tracts in early larval zebrafish. **The Journal of comparative neurology**, v. 518, n. 4, p. 439–58, 15 mar. 2010.

KAWAUCHI, H.; BAKER, B. I. Melanin-concentrating hormone signaling systems in fish. **Peptides**, v. 25, n. 10, p. 1577–84, out. 2004.

KIM, S. F. et al. Antipsychotic drug-induced weight gain mediated by histamine H1 receptor-linked activation of hypothalamic AMP-kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 9, p. 3456–9, 27 fev. 2007.

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.

KINDT, K. S. et al. Dopamine mediates context-dependent modulation of sensory plasticity in *C. elegans*. **Neuron**, v. 55, n. 4, p. 662–76, 16 ago. 2007.

KIRK, S. L. et al. Olanzapine-induced weight gain in the rat: role of 5-HT<sub>2C</sub> and histamine H1 receptors. **Psychopharmacology**, v. 207, n. 1, p. 119–25, nov. 2009.

KOKEL, D. et al. Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish. **Nature chemical biology**, v. 6, n. 3, p. 231–237, mar. 2010.

KOKEL, D. et al. Behavioral barcoding in the cloud: embracing data-intensive digital phenotyping in neuropharmacology. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 8, p. 421–5, ago. 2012.

KOKEL, D.; PETERSON, R. T. Chemobehavioural phenomics and behaviour-based psychiatric drug discovery in the zebrafish. **Briefings in functional genomics & proteomics**, v. 7, n. 6, p. 483–90, nov. 2008.

KOLA, I.; LANDIS, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 8, p. 711–5, ago. 2004.

- KROEZE, W. K. et al. H1-histamine receptor affinity predicts short-term weight gain for typical and atypical antipsychotic drugs. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 3, p. 519–26, mar. 2003.
- KUBICKI, M. Voxel-Based Morphometric Analysis of Gray Matter in First Episode Schizophrenia. **NeuroImage**, v. 17, n. 4, p. 1711–1719, dez. 2002.
- LAVIOLETTE, S. R. Dopamine modulation of emotional processing in cortical and subcortical neural circuits: evidence for a final common pathway in schizophrenia? **Schizophrenia bulletin**, v. 33, n. 4, p. 971–81, jul. 2007.
- LEE, T. H.; LERNER, A. B. Isolation of melanocyte-stimulating hormone from hog pituitary gland. **The Journal of biological chemistry**, v. 221, n. 2, p. 943–59, ago. 1956.
- LEITE, J. V; GUIMARÃES, F. S.; MOREIRA, F. A. Aripiprazole, an atypical antipsychotic, prevents the motor hyperactivity induced by psychotomimetics and psychostimulants in mice. **European journal of pharmacology**, v. 578, n. 2-3, p. 222–7, 14 jan. 2008.
- LEUCHT, S. et al. Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis. **Lancet**, v. 6736, n. 13, p. 1–12, 26 jun. 2013.
- LEYSEN, J. E. et al. Receptor binding profile of R 41 468, A novel antagonist at 5-HT<sub>2</sub> receptors. **Life Sciences**, v. 28, n. 9, p. 1015–1022, mar. 1981.
- LI, P. et al. Cloning and spatial and temporal expression of the zebrafish dopamine D1 receptor. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 236, n. 5, p. 1339–46, maio. 2007.
- LIEBERMAN, J. A. et al. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. **The New England journal of medicine**, v. 353, n. 12, p. 1209–23, 22 set. 2005.
- LILLESAAR, C. The serotonergic system in fish. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 41, n. 4, p. 294–308, jul. 2011.
- LINDSEY, B. W.; SMITH, F. M.; CROLL, R. P. From inflation to flotation: contribution of the swimbladder to whole-body density and swimming depth during development of the zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish**, v. 7, n. 1, p. 85–96, mar. 2010.

LOGAN, D. W.; BURN, S. F.; JACKSON, I. J. Regulation of pigmentation in zebrafish melanophores. **Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society**, v. 19, n. 3, p. 206–13, jun. 2006.

LOPEZ, A. D.; MURRAY, C. J. L. The global burden of disease, 1990 – 2020. **Nature Medicine**, v. 4, n. 11, p. 1241–1243, 1998.

MA, P. Catecholaminergic systems in the zebrafish. III. Organization and projection pattern of medullary dopaminergic and noradrenergic neurons. **Journal of Comparative Neurology**, v. 381, n. 4, p. 411–427, 1997.

MAAYAN, L.; VAKHRUSHEVA, J.; CORRELL, C. U. Effectiveness of medications used to attenuate antipsychotic-related weight gain and metabolic abnormalities: a systematic review and meta-analysis. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 7, p. 1520–30, jun. 2010.

MACPHAIL, R. C. et al. Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. **Neurotoxicology**, v. 30, n. 1, p. 52–8, jan. 2009.

MATTHEWS, J. L. Common diseases of laboratory zebrafish. **Methods in cell biology**, v. 77, p. 617–43, jan. 2004.

MCEVOY, J. P. et al. Effectiveness of clozapine versus olanzapine, quetiapine, and risperidone in patients with chronic schizophrenia who did not respond to prior atypical antipsychotic treatment. **The American journal of psychiatry**, v. 163, n. 4, p. 600–10, abr. 2006.

MCLEAN, D. L.; FETCHO, J. R. Ontogeny and innervation patterns of dopaminergic, noradrenergic, and serotonergic neurons in larval zebrafish. **The Journal of comparative neurology**, v. 480, n. 1, p. 38–56, 29 nov. 2004.

MELTZER, H.; MATSUBARA, S.; LEE, J. Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin2 pKi values. **Journal of Pharmacology and ...**, v. 251, n. 1, p. 238–246, 1989.

MELTZER, H. Y. The role of serotonin in antipsychotic drug action. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 2 Suppl, p. 106S–115S, ago. 1999.

MELTZER, H. Y. Update on typical and atypical antipsychotic drugs. **Annual review of medicine**, v. 64, p. 393–406, jan. 2013.

MELTZER, H. Y.; HORIGUCHI, M.; MASSEY, B. W. The role of serotonin in the NMDA receptor antagonist models of psychosis and cognitive impairment. **Psychopharmacology**, v. 213, n. 2-3, p. 289–305, fev. 2011.

MEYER, A; SCHARTL, M. Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. **Current opinion in cell biology**, v. 11, n. 6, p. 699–704, dez. 1999.

MICZEK, K. A; DE WIT, H. Challenges for translational psychopharmacology research--some basic principles. **Psychopharmacology**, v. 199, n. 3, p. 291–301, ago. 2008.

MINET-RINGUET, J. et al. Alterations of lipid metabolism and gene expression in rat adipocytes during chronic olanzapine treatment. **Molecular psychiatry**, v. 12, n. 6, p. 562–71, jun. 2007.

MINOKOSHI, Y. et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. **Nature**, v. 428, n. 6982, p. 569–74, 1 abr. 2004.

MOHN, A. R. et al. Mice with Reduced NMDA Receptor Expression Display Behaviors Related to Schizophrenia. **Cell**, v. 98, n. 4, p. 427–436, 20 ago. 1999.

MONCRIEFF, J. Clozapine v. conventional antipsychotic drugs for treatment-resistant schizophrenia: a re-examination. **The British journal of psychiatry : the journal of mental science**, v. 183, p. 161–6, ago. 2003.

MUELLER, T.; VERNIER, P.; WULLIMANN, M. F. The adult central nervous cholinergic system of a neurogenetic model animal, the zebrafish *Danio rerio*. **Brain research**, v. 1011, n. 2, p. 156–69, 18 jun. 2004.

MUELLER, T.; WULLIMANN, M. F. An evolutionary interpretation of teleostean forebrain anatomy. **Brain, behavior and evolution**, v. 74, n. 1, p. 30–42, jan. 2009.

NALLY, R. E. et al. Ethologically based resolution of D2-like dopamine receptor agonist-versus antagonist-induced behavioral topography in dopamine- and adenosine 3',5'-monophosphate-regulated phosphoprotein of 32 kDa “knockout” mutants congenic on the C57BL/6 genetic backgr. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 310, n. 3, p. 1281–7, set. 2004.

NESTLER, E. J.; HYMAN, S. E.; MALENKA, R. C. **Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience**. 2nd ed. ed. [s.l.] McGraw-Hill Professional, 2008.



NIEMEGERES, C. J.; JANSSEN, P. A. A comparative study of the inhibitory effects of haloperidol and trifluoperidol on learned shock-avoidance behavioural habits and on apomorphine-induced emesis in mongrel dogs and in beagles. **Psychopharmacologia**, v. 8, n. 4, p. 263–70, 16 nov. 1965.

NORTON, W. H. J.; FOLCHERT, A.; BALLY-CUIF, L. Comparative analysis of serotonin receptor (HTR1A/HTR1B families) and transporter (slc6a4a/b) gene expression in the zebrafish brain. **The Journal of comparative neurology**, v. 511, n. 4, p. 521–42, 1 dez. 2008.

NUSSLEIN-VOLHARD, C.; DAHM, R. (EDS.). **Zebrafish: A Practical Approach**. 1st Ed. ed. [s.l.] Oxford University Press, USA, 2002.

O'NEILL, M. F.; SHAW, G. Comparison of dopamine receptor antagonists on hyperlocomotion induced by cocaine, amphetamine, MK-801 and the dopamine D1 agonist C-APB in mice. **Psychopharmacology**, v. 145, n. 3, p. 237–50, ago. 1999.

PANGALOS, M. N.; SCHECHTER, L. E.; HURKO, O. Drug development for CNS disorders: strategies for balancing risk and reducing attrition. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 6, n. 7, p. 521–32, jul. 2007.

PARICHY, D. M. Evolution of danio pigment pattern development. **Heredity**, v. 97, n. 3, p. 200–10, set. 2006.

PEITSARO, N. et al. Identification of zebrafish histamine H1, H2 and H3 receptors and effects of histaminergic ligands on behavior. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, n. 8, p. 1205–1214, abr. 2007.

PORSOLT, R.; MOSER, P.; CASTAGNÉ, V. Behavioral indices in antipsychotic drug discovery. **Journal of Pharmacology and ...**, v. 333, n. 3, p. 632–638, 2010.

POUPARD, G. et al. Apolipoprotein E gene expression correlates with endogenous lipid nutrition and yolk syncytial layer lipoprotein synthesis during fish development. **Cell and tissue research**, v. 300, n. 2, p. 251–61, maio. 2000.

PRICE, A. C. et al. Pigments, patterns, and fish behavior. **Zebrafish**, v. 5, n. 4, p. 297–307, dez. 2008.

PROTAIS, P.; COSTENTIN, J.; SCHWARTZ, J. C. Climbing behavior induced by apomorphine in mice: a simple test for the study of dopamine receptors in striatum. **Psychopharmacology**, v. 50, n. 1, p. 1–6, 1976.

RAVEENDRAN, N. S. et al. Rapid tranquillisation in psychiatric emergency settings in India: pragmatic randomised controlled trial of intramuscular

olanzapine versus intramuscular haloperidol plus promethazine. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 335, n. 7625, p. 865, 27 out. 2007.

REYNOLDS, G. P.; KIRK, S. L. Metabolic side effects of antipsychotic drug treatment--pharmacological mechanisms. **Pharmacology & therapeutics**, v. 125, n. 1, p. 169–79, jan. 2010.

RIEGER, P. W.; SUMMERFELT, R. C. Microvideography of gas bladder inflation in larval walleye. **Journal of Fish Biology**, v. 53, n. 1, p. 93–99, jul. 1998.

RIEHL, R. et al. Behavioral and physiological effects of acute ketamine exposure in adult zebrafish. **Neurotoxicology and teratology**, v. 33, n. 6, p. 658–67, 2011.

RIHEL, J. et al. Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 327, n. 5963, p. 348–51, 15 jan. 2010.

RIHEL, J. et al. Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 327, n. 5963, p. 348–51, 15 jan. 2010.

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.

RINK, E.; WULLIMANN, M. F. Development of the catecholaminergic system in the early zebrafish brain: an immunohistochemical study. **Brain research. Developmental brain research**, v. 137, n. 1, p. 89–100, 30 jul. 2002.

ROBERTSON, G. Development of the swimbladder and its innervation in the zebrafish, *Danio rerio*. **Journal of ...**, p. 967–985, 2007.

ROBINSON, T. E.; BECKER, J. B. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. **Brain research**, v. 396, n. 2, p. 157–98, jun. 1986.

ROGERS, C. et al. Inhibition of *Caenorhabditis elegans* social feeding by FMRFamide-related peptide activation of NPR-1. **Nature neuroscience**, v. 6, n. 11, p. 1178–85, nov. 2003.

ROMBOUGH, P. Gills are needed for ionoregulation before they are needed for O<sub>2</sub> uptake in developing zebrafish, *Danio rerio*. **The Journal of experimental biology**, v. 205, n. Pt 12, p. 1787–94, jun. 2002.

- ROTH, B. L.; SHEFFLER, D. J.; KROEZE, W. K. Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 4, p. 353–9, abr. 2004.
- ROUBOS, E. W.; SCHEENEN, W. J. J. M.; JENKS, B. G. Neuronal, neurohormonal, and autocrine control of *Xenopus* melanotrope cell activity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1040, p. 172–83, abr. 2005.
- RUNG, J. P. et al. (+)-MK-801 induced social withdrawal in rats; a model for negative symptoms of schizophrenia. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 29, n. 5, p. 827–32, jun. 2005.
- RUPP, B.; WULLIMANN, M. F.; REICHERT, H. The zebrafish brain: a neuroanatomical comparison with the goldfish. **Anatomy and embryology**, v. 194, n. 2, p. 187–203, ago. 1996.
- RUUSKANEN, J. O. et al. Identification of duplicated fourth alpha2-adrenergic receptor subtype by cloning and mapping of five receptor genes in zebrafish. **Molecular biology and evolution**, v. 21, n. 1, p. 14–28, jan. 2004.
- RUUSKANEN, J. O. et al. Expression and function of alpha-adrenoceptors in zebrafish: drug effects, mRNA and receptor distributions. **Journal of neurochemistry**, v. 94, n. 6, p. 1559–69, set. 2005.
- SACHER, J. et al. Effects of olanzapine and ziprasidone on glucose tolerance in healthy volunteers. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 7, p. 1633–41, jun. 2008.
- SAMAHA, A.-N. et al. Less is more: antipsychotic drug effects are greater with transient rather than continuous delivery. **Biological psychiatry**, v. 64, n. 2, p. 145–52, 15 jul. 2008.
- SAMS-DODD, F. Target-based drug discovery: is something wrong ? **Drug discovery today**, v. 10, n. 2, p. 139–147, 2005.
- SANTORIELLO, C.; ZON, L. I. Hooked! Modeling human disease in zebrafish. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 7, p. 2337–43, 2 jul. 2012.
- SAUR, T. et al. A genome-wide RNAi screen in *Caenorhabditis elegans* identifies the nicotinic acetylcholine receptor subunit ACR-7 as an antipsychotic drug target. **PLoS genetics**, v. 9, n. 2, p. e1003313, jan. 2013.
- SAWIN, E. R.; RANGANATHAN, R.; HORVITZ, H. R. C. *elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by

experience through a serotonergic pathway. **Neuron**, v. 26, n. 3, p. 619–31, jun. 2000.

SCHLEGEL, A.; STAINIER, D. Y. R. Lessons from “lower” organisms: what worms, flies, and zebrafish can teach us about human energy metabolism. **PLoS genetics**, v. 3, n. 11, p. e199, nov. 2007.

SCHNEIDER, H. et al. Cloning and expression of a zebrafish 5-HT(2C) receptor gene. **Gene**, v. 502, n. 2, p. 108–17, 10 jul. 2012.

SCHWEITZER, J.; DRIEVER, W. Development of the dopamine systems in zebrafish. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 651, p. 1–14, jan. 2009.

SCHWERTE, T. Non-invasive imaging of blood cell concentration and blood distribution in zebrafish *Danio rerio* incubated in hypoxic conditions in vivo. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 8, p. 1299–1307, 15 abr. 2003.

SCISLOWSKI, P. W. et al. Biochemical mechanisms responsible for the attenuation of diabetic and obese conditions in ob/ob mice treated with dopaminergic agonists. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 23, n. 4, p. 425–31, abr. 1999.

SEEMAN, P.; LEE, T. Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. **Science**, v. 188, n. 4194, p. 1217–1219, 20 jun. 1975.

SEIBT, K. J. et al. Antipsychotic drugs prevent the motor hyperactivity induced by psychotomimetic MK-801 in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural brain research**, v. 214, n. 2, p. 417–22, 25 dez. 2010.

SELEMON, L.; RAJKOWSKA, G.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Elevated Neuronal Density in Prefrontal Area 46 in Brains From Schizophrenic Patients: Application of a Three-Dimensional, Stereologic Counting Method. **Journal of comparative Neurology**, v. 392, n. December 1997, p. 402–412, 1998.

SHEN, W. A history of antipsychotic drug development. **Comprehensive psychiatry**, v. 40, n. 6, p. 407–414, 1999.

SHIMADA, M. et al. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. **Nature**, v. 396, n. 6712, p. 670–4, 17 dez. 1998.

SHIRAKI, T.; KOJIMA, D.; FUKADA, Y. Light-induced body color change in developing zebrafish. **Photochemical & photobiological sciences : Official**

**journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v. 9, n. 11, p. 1498–504, nov. 2010.

SMEETS, W. J. A. J.; GONZÁLEZ, A. Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. **Brain Research Reviews**, v. 33, n. 2-3, p. 308–379, set. 2000.

SMITH, F. M.; CROLL, R. P. Autonomic control of the swimbladder. **Autonomic neuroscience : basic & clinical**, v. 165, n. 1, p. 140–8, 16 nov. 2011.

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. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 14, p. 5512–25, 6 abr. 2011.

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

STEFANIDIS, A. et al. The role of thermogenesis in antipsychotic drug-induced weight gain. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 17, n. 1, p. 16–24, jan. 2009.

STIERNAGLE, T. Maintenance of *C. elegans*. **WormBook : the online review of C. elegans biology**, p. 1–11, jan. 2006.

STREISINGER, G. et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). **Nature**, v. 291, n. 5813, p. 293–296, 28 maio. 1981.

SWINNEY, D. C.; ANTHONY, J. How were new medicines discovered? **Nature reviews. Drug discovery**, v. 10, n. 7, p. 507–19, jul. 2011.

THEISEN, F. M. et al. No evidence for binding of clozapine, olanzapine and/or haloperidol to selected receptors involved in body weight regulation. **The pharmacogenomics journal**, v. 7, n. 4, p. 275–81, ago. 2007.

THIRUMALAI, V.; CLINE, H. T. Endogenous dopamine suppresses initiation of swimming in prefeeding zebrafish larvae. **Journal of neurophysiology**, v. 100, n. 3, p. 1635–48, set. 2008.

TIIHONEN, J. et al. 11-year follow-up of mortality in patients with schizophrenia: a population-based cohort study (FIN11 study). **Lancet**, v. 374, n. 9690, p. 620–7, 22 ago. 2009.

TINGAUD-SEQUEIRA, A.; OUADAH, N.; BABIN, P. J. Zebrafish obesogenic test: a tool for screening molecules that target adiposity. **Journal of lipid research**, v. 52, n. 9, p. 1765–72, set. 2011.

- TSAI, G.; COYLE, J. Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. **Annual Review of Pharmacology and ...**, v. 42, p. 165–179, 2002.
- TUINHOF, R. et al. Involvement of retinohypothalamic input, suprachiasmatic nucleus, magnocellular nucleus and locus coeruleus in control of melanotrope cells of *Xenopus laevis*: a retrograde and anterograde tracing study. **Neuroscience**, v. 61, n. 2, p. 411–20, jul. 1994.
- VAN DER GOOT, H.; TIMMERMAN, H. Selective ligands as tools to study histamine receptors. **European journal of medicinal chemistry**, v. 35, n. 1, p. 5–20, jan. 2000.
- VAN OS, J.; KAPUR, S. Schizophrenia. **Lancet**, v. 374, n. 9690, p. 635–45, 22 ago. 2009.
- VASSE, M. et al. Unexpected potentiation by discriminant benzamide derivatives of stereotyped behaviours elicited by dopamine agonists in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 329, n. 2, p. 108–116, abr. 1985.
- VESTRI, H. S. et al. Atypical antipsychotic drugs directly impair insulin action in adipocytes: effects on glucose transport, lipogenesis, and antilipolysis. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 11, p. 2431–2; author reply 2433–4, nov. 2007.
- VICTORIANO, M. et al. Early perturbation in feeding behaviour and energy homeostasy in olanzapine-treated rats. **Psychopharmacology**, v. 206, n. 1, p. 167–76, set. 2009.
- VOLAVKA, J. Clozapine is gold standard, but questions remain. **The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)**, v. 15, n. 9, p. 1201–4, out. 2012.
- VOS, T. et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2163–96, 15 dez. 2012.
- WADDINGTON, J. L. et al. Phenotypic studies on dopamine receptor subtype and associated signal transduction mutants: insights and challenges from 10 years at the psychopharmacology-molecular biology interface. **Psychopharmacology**, v. 181, n. 4, p. 611–38, out. 2005.
- WADENBERG, M. L. et al. Dopamine D(2) receptor occupancy is a common mechanism underlying animal models of antipsychotics and their clinical effects.

**Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 5, p. 633–41, nov. 2001.

WADENBERG, M. L.; HICKS, P. B. The conditioned avoidance response test re-evaluated: is it a sensitive test for the detection of potentially atypical antipsychotics? **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 23, n. 6, p. 851–62, jan. 1999.

WAGLE, M.; MATHUR, P.; GUO, S. Corticotropin-releasing factor critical for zebrafish camouflage behavior is regulated by light and sensitive to ethanol. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 31, n. 1, p. 214–24, 5 jan. 2011.

WALLINGFORD, N. M. et al. Zonisamide prevents olanzapine-associated hyperphagia, weight gain, and elevated blood glucose in rats. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 33, n. 12, p. 2922–33, nov. 2008.

WANG, R. Y.; LIANG, X. M100907 and clozapine, but not haloperidol or raclopride, prevent phencyclidine-induced blockade of NMDA responses in pyramidal neurons of the rat medial prefrontal cortical slice. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 1, p. 74–85, jul. 1998.

WANG, Z. et al. Zebrafish beta-adrenergic receptor mRNA expression and control of pigmentation. **Gene**, v. 446, n. 1, p. 18–27, 1 out. 2009.

WEINER, D. M. et al. 5-hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor inverse agonists as antipsychotics. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 299, n. 1, p. 268–76, out. 2001.

WESTERFIELD, M. **The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)**. 4th ed. ed. Eugene: Univ. of Oregon Press, 2000.

WILSON, J. M.; BUNTE, R. M.; CARTY, A. J. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS**, v. 48, n. 6, p. 785–9, nov. 2009.

WILSON, S. W.; HOUART, C. Early steps in the development of the forebrain. **Developmental cell**, v. 6, n. 2, p. 167–81, fev. 2004.

WOLMAN, M. A et al. Chemical modulation of memory formation in larval zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 37, p. 15468–73, 13 set. 2011.

WOLMAN, M.; GRANATO, M. Behavioral genetics in larval zebrafish: learning from the young. **Developmental neurobiology**, v. 72, n. 3, p. 366–72, mar. 2012.

WOO, T. U. et al. A subclass of prefrontal gamma-aminobutyric acid axon terminals are selectively altered in schizophrenia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 9, p. 5341–6, 28 abr. 1998.

WULLIMANN, M. F.; MUELLER, T. Teleostean and mammalian forebrains contrasted: Evidence from genes to behavior. **The Journal of comparative neurology**, v. 475, n. 2, p. 143–62, 19 jul. 2004.

WULLIMANN, M. F.; RUPP, B.; REICHERT, H. **Neuroanatomy of the Zebrafish Brain**. Basel: Birkhäuser Basel, 1996. p. 144

XU, Y. et al. 5-HT<sub>2</sub>CRs expressed by pro-opiomelanocortin neurons regulate energy homeostasis. **Neuron**, v. 60, n. 4, p. 582–9, 26 nov. 2008.

YAMADA, Y. et al. Prediction and assessment of extrapyramidal side effects induced by risperidone based on dopamine D(2) receptor occupancy. **Synapse (New York, N.Y.)**, v. 46, n. 1, p. 32–7, out. 2002.

ZHANG, Y. et al. Cocaine self-administration in mice is inversely related to phosphorylation at Thr34 (protein kinase A site) and Ser130 (kinase CK1 site) of DARPP-32. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 10, p. 2645–51, 8 mar. 2006.

ZON, L. I.; PETERSON, R. T. In vivo drug discovery in the zebrafish. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 4, n. 1, p. 35–44, jan. 2005.