

RAFAELA ALMADA AMARAL

**O zebrafish (*Danio rerio*) como modelo de estudo das bases  
desenvolvimentais da esquizofrenia: regulação da via intracelular  
dopaminérgica DARPP-32/Akt durante o neurodesenvolvimento**

Trabalho de Conclusão de Curso (Projeto)  
apresentado ao Programa de Pós Graduação em  
Neurociências da Universidade Federal de Minas  
Gerais, como parte dos requisitos para a obtenção  
do título de Especialista em Neurociências.

Orientador: Prof. Bruno Rezende de Souza

Coorientador: Prof. Flávio Afonso Gonçalves Mourão

Belo Horizonte

2015

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO:</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1 Sinalização Dopaminérgica:</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2 O sistema dopaminérgico e a esquizofrenia:</b> .....	<b>7</b>
<b>1.3 Bases neurodesenvolvimentais da Esquizofrenia:</b> .....	<b>7</b>
<b>1.4 Neurodesenvolvimento:</b> .....	<b>8</b>
<b>1.5 Dopamina e neurodesenvolvimento:</b> .....	<b>9</b>
<b>1.6 Zebrafish como modelo experimental:</b> .....	<b>9</b>
<b>1.7 Sistema dopaminérgico na larva do zebrafish:</b> .....	<b>10</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA:</b> .....	<b>12</b>
<b>3. OBJETIVOS:</b> .....	<b>13</b>
<b>3.1 Objetivo geral:</b> .....	<b>13</b>
<b>3.2 Objetivos específicos:</b> .....	<b>13</b>
<b>4. MÉTODOS:</b> .....	<b>14</b>
<b>4.1 Animais:</b> .....	<b>14</b>
<b>4.2 Cruzamento:</b> .....	<b>14</b>
<b>4.3 Procedimento de tratamento farmacológico:</b> .....	<b>14</b>
<b>4.4 Procedimentos de dissecação cerebral:</b> .....	<b>15</b>
<b>4.6 Imunofluorescência e microscopia confocal:</b> .....	<b>16</b>
<b>5. CRONOGRAMA:</b> .....	<b>17</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>18</b>

# 1. INTRODUÇÃO:

## 1.1 Sinalização Dopaminérgica:

A dopamina (DA) é um neurotransmissor monoaminérgico da família das catecolaminas e precursor de outros neurotransmissores catecolamínicos como: noradrenalina e adrenalina. Ela está envolvida em inúmeras funções desde o controle do movimento a processos cognitivos e motivacionais, por exemplo, mecanismos de formação de memórias (MA e LOPEZ, 2003). As primeiras etapas da síntese de DA consiste na conversão da tirosina em L-DOPA (1-3,4-diidroxifenilalanina ou levodopa) e esta por sua vez, em DA. Essas reações são catalisadas pela enzima tirosina hidroxilase (TH) e pela descarboxilase de aminoácido aromático (AADC), respectivamente, as quais sintetizam DA no terminal pré-sináptico do neurônio dopaminérgico (RINK e WILLIMANN, 2002). Após o processo de síntese, a DA é armazenada em vesículas sinápticas e liberada quando há despolarização da membrana pré-sináptica do neurônio dopaminérgico. Nessa sinalização participam também o transportador de DA (DAT), proteína responsável pela sua recaptação na fenda sináptica. As enzimas como amonoamina oxidase (MAO) e a catecol-O-metil transferase (COMT) inativam a ação da DA tanto central quanto periféricamente (RINK e WILLIMANN, 2001) (Figura 1).

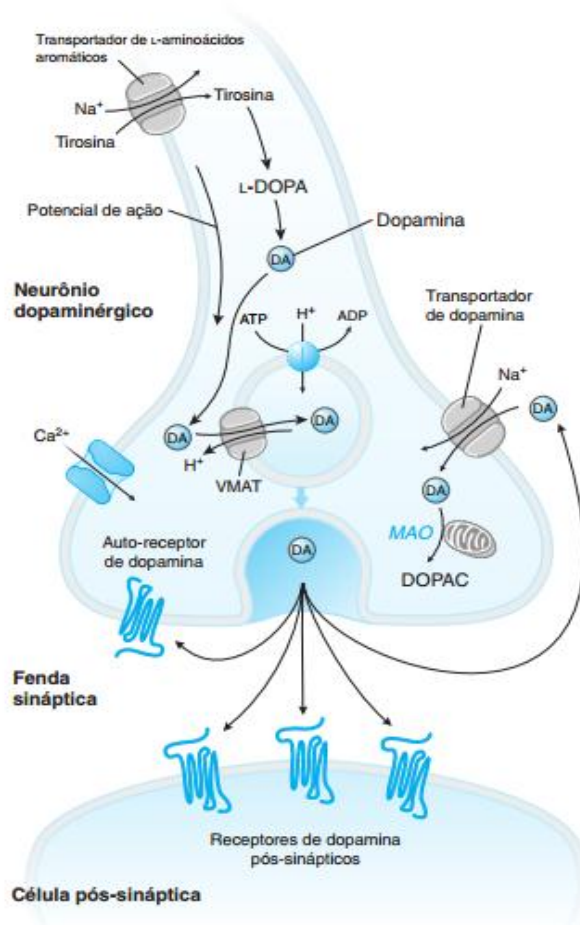


Fig 1: Neurotransmissão dopaminérgica nos mamíferos. Fonte: STANDAERT e GALANTER, 2008.

No cérebro adulto dos mamíferos, a DA é distribuída de forma circunscrita, formando 4 vias dopaminérgicas (Figura 2), chamadas de: via nigroestriatal, via mesolímbica, via mesocortical e via túbero-infundibular (MOORE e BLOOM, 1978). A primeira, nigroestriatal, possui suas projeções saindo da substância negra do mesencéfalo, e está relacionada com a atividade motora somática. A via mesolímbica, conecta a área tegumentar ventral (VTA) com o sistema límbico, isto é, *nucleus accumbens*, amígdala e hipocampo. Esta via modula as emoções. A via mesocortical está funcionalmente ligada ao desenvolvimento de funções cognitivas como: atenção e aprendizagem. Suas projeções saem da VTA até o córtex pré-frontal. Por último, a via

túbero-infundibular que projeta-se do hipotálamo para a hipófise anterior, e está intimamente responsável pela regulação da secreção de diversos hormônios.

A DA foi por um tempo considerada como um neurotransmissor inibitório, em virtude da supressão da atividade espontânea de neurônios do córtex pré-frontal, em experimentos em que ela foi aplicada de forma exógena (CONNOR, 1970). Mas estudos eletrofisiológicos sugerem que a DA apresenta um caráter modulatório, inibindo ou potenciando respostas evocadas por outros neurotransmissores (BARCHAS *et al.*, 1978). Neste contexto, sabe-se que as projeções dopaminérgicas têm importante papel na rápida modulação de neurônios GABAérgicos e glutamatérgicos (KELLENDONK, 2006).

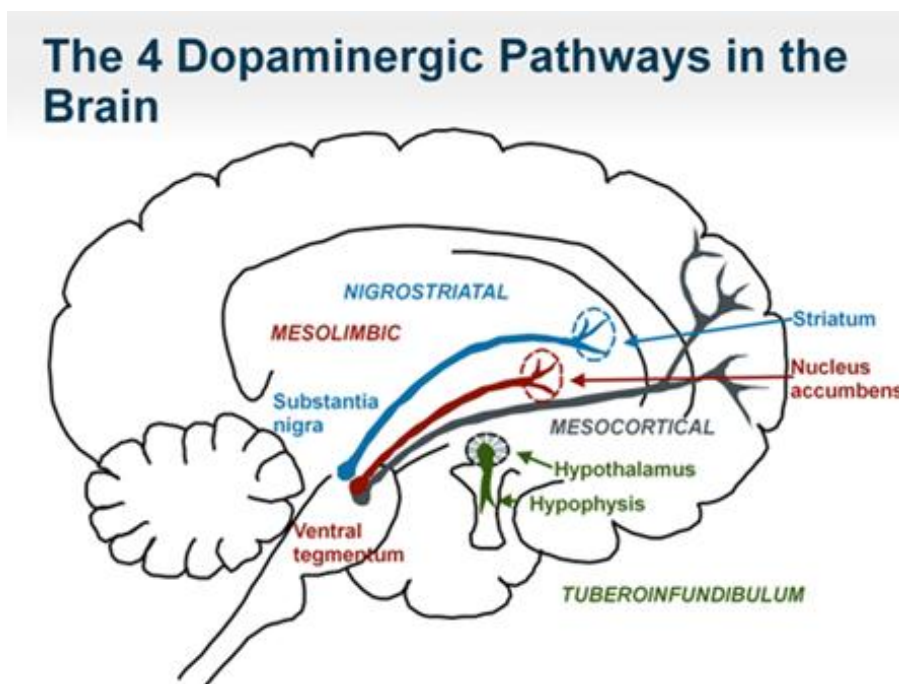


Fig 2.: Quatro projeções das vias dopaminérgicas. Fonte: STEFAN LEUTCH *et al.*, 2011.

A sinalização dopaminérgica possui receptores definidos como D1 a D5, de acordo com a sua ordem de descoberta. Entretanto, os receptores dopaminérgicos são

divididos em dois grupos: receptores do tipo D1, que incluem os receptores D1 e D5, e receptores do tipo D2, que incluem os receptores D2, D3 e D4 (NEVE *et al.*, 2004). Todos pertencem a mesma família de receptores acoplados a proteína G ou receptores metabotrópicos (NEVE *et al.*, 2004). Ambos estão presentes no córtex pré-frontal, mas o receptor do tipo D1 está primordialmente localizado no corpo estriado e no neocórtex. Os receptores da família D1 são acoplados a proteína G estimulatórias (Gs), a qual estimula a adenilato ciclase (AC) e conseqüentemente leva ao aumento dos níveis de AMPcíclico (AMPC), que sinaliza ativação da proteína quinase A (PKA) (THIRUMALAI e CLINE, 2008). A PKA fosforila diversos substratos, dentre eles: canais de cálcio, diferentes receptores e fatores de transcrição (ALBERT *et al.*, 2002). Além disso, quando ativada, a PKA fosforila a proteína DARPP-32. A DARPP-32 fosforilada inibe a proteína fosfatase 1 (PP1), que é responsável pela regulação dos canais de sódio, cálcio e a função de diversos receptores (SVENNINGSSON *et al.*, 2004).

Os receptores do tipo D2 são encontrados primordialmente nas regiões do corpo estriado, substância negra e hipófise. Os receptores do tipo D2 estão acoplados a proteína G inibitória (Gi), que inativa AC reduzindo os níveis de AMPC. A redução dos níveis de AMPC diminui a atividade da PKA e, conseqüentemente reduz a fosforilação da DARPP-32 (SVENNINGSSON *et al.*, 2004).

Simultaneamente, quando a DA se liga ao receptor D2 ocorre à formação de um complexo com  $\beta$ -arrestina e proteína fosfatase 2 (PP2A). Este complexo promove à desativação da Akt por PP2A através da desfosforilação de Akt no sítio treonina 308 (BEAULIEU *et al.*, 2008). Esta inibição leva a uma diminuição da fosforilação de GSK-3, modulando de forma geral o sistema de recompensa e o comportamento motor. Essa inibição específica modula muitas vias de transdução de sinal, que regulam vários

processos celulares, como a transcrição de proteínas, a apoptose (morte celular programada) e a proliferação celular.

Além das regulações das vias descritas anteriormente (Figura 3), os receptores D1 e D2 podem também interagir, formando heterodímeros que ativam a fosfolipase C (PLC), uma via que participa na modulação do nível de cálcio intracelular.

Sabe-se que as alterações na sinalização dopaminérgica estão envolvidas em diversos transtornos neuropsiquiátricos. Por exemplo, alterações funcionais no receptor D1 e no DAT estão relacionados ao transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH). Já alterações na sinalização do receptor D2, nos níveis de DARPP-32 e de Akt estão relacionados com a esquizofrenia (SEEMAN *et al.*, 2005).

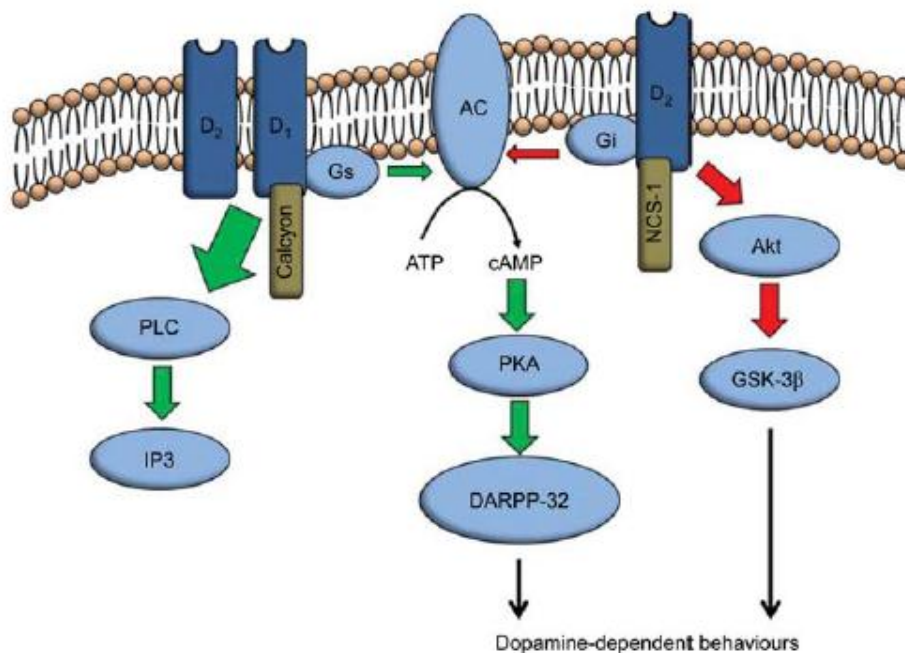


Fig 3: Vias intracelulares dopaminérgicas. Fonte: SOUZA e TROPEPE, 2011.

## **1.2 O sistema dopaminérgico e a esquizofrenia:**

A esquizofrenia é um transtorno psiquiátrico que atinge 1% da população (SOUZA e TROPEPE, 2011) e seu diagnóstico ocorre, nos homens, entre 20 e 25 anos, enquanto que nas mulheres, ocorre entre 25 e 35 anos (SHIRAWAUA, 2000). A “hipótese dopaminérgica” para a esquizofrenia é baseada na observação de que o receptor dopaminérgico do tipo D2 é o principal alvo dos antipsicóticos típicos de ação antagonista (SILVA, 2006), e sua administração reduz vários dos sintomas da esquizofrenia (SOUZA *et al.*, 2011).

Além da evidência farmacológica, ainda existem evidências bioquímicas que sustentam a hipótese dopaminérgica para a esquizofrenia. O excesso de dopamina em vias mesolímbicas está associado aos sintomas chamados de positivos (delírios e alucinações). Já o déficit na via mesocortical está associada aos sintomas negativos (declínio cognitivo) (SILLIVAN e KONRADI, 2011). Sabe-se que a via intracelular da DARPP-32, que é regulada por diversos receptores, pode estar envolvida com mudanças fisiológicas nos níveis de dopamina e glutamato. O glutamato, DARPP-32 e a sinalização de Akt estão regulados negativamente no córtex pré-frontal de pacientes esquizofrênicos e com transtorno bipolar (ALBERT *et al.*, 2002).

## **1.3 Bases neurodesenvolvimentais da Esquizofrenia:**

Além das evidências genéticas do envolvimento dos genes *notch* e *wnt* na esquizofrenia (COTTER *et al.*, 1998; WEI e HEMMINGGS, 2000), existem diversas alterações morfológicas no cérebro de pacientes esquizofrênicos que sustentam a hipótese neurodesenvolvimental para a etiologia. Os pacientes possuem diminuição da substância cinzenta, alargamento de ventrículos e sulcos corticais. Além disto, os



pacientes apresentam redução das regiões temporais, frontais, occipitais, amígdala e hipocampo (MUSER e MCGURK, 2004).

No período do desenvolvimento, é possível que os níveis elevados de dopamina reduzam a taxa de neurogênese e assim, simultaneamente, os genes envolvidos na diferenciação celular, a migração e extensão de neurônios (VICENTE, *et al.*, 1997; FATEMI, 2001; MUGLIA *et al.*, 2003; SQUASSINA *et al.*, 2010). Mutações em DISC1 humano, um gene que regula neurogênese e amadurecimento neuronal (CHUBB *et al.*, 2008; NIWA *et al.*, 2010), está associado com esquizofrenia, autismo, transtorno bipolar e depressão (CHUBB *et al.*, 2008). Estas descobertas sugerem fortemente que a desregulação da dopamina durante a neurogênese pode, em parte, explicar a morfologia e os comportamentos que podem manifestar desordens neuropsiquiátricas.

#### **1.4 Neurodesenvolvimento:**

O desenvolvimento neurológico acontece em 4 estágios: neurogênese, diferenciação, migração e sinaptogênese. A neurogênese, está relacionada ao desenvolvimento e fechamento do tubo neural. A diferenciação é caracterizada pela formação de diferentes tipos neuronais, dentre eles neurônios motores e neurônios sensoriais. A migração é caracterizada pela migração das novas células para regiões alvo/específicas. E por último a sinaptogênese, caracterizada pela formação de novas conexões entre os neurônios (SILVA, 2006).

As diversas desordens neurodesenvolvimentais podem acontecer quando há malformação de sulcos e giros, além de processos neurodegenerativos que culminam com a morte de neurônios e em problemas no fechamento do tubo neural (MONTEIRO, KANDRATAVICIUS, LEITE, 2011). Por exemplo, no caso do autismo, existe uma

associação com genes como a *neurexin1*, que é funcionalmente envolvido na sinaptogênese, e *met*, que tem um papel na migração neuronal (CAMPBELL *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2008). O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) tem vários papéis no desenvolvimento do cérebro e no polimorfismo de um único nucleótido Val66Met e está associado ao transtorno bipolar (POST, 2007). Portanto, existem diversos fatores que podem desencadear as desordens em estágios diferentes do neurodesenvolvimento, como sinaptogênese (desenvolvimento de sinapses), poda (retirada de sinapses que não são mais utilizadas) e apoptose (morte celular programada) (KEMPINAS, 2013).

### **1.5 Dopamina e neurodesenvolvimento:**

A maquinaria da sinalização dopaminérgica é expressa a partir da terceira semana de gestação nos mamíferos (NEVE *et al.*, 2004). Foi evidenciado que o equilíbrio entre a sinalização dos receptores do tipo D1 e D2 possivelmente está envolvido no controle da migração de neurônios GABAérgicos gerados na parte frontal do cérebro (KEMPINAS, 2013). Sabe-se que, em cérebro da larva do zebrafish, a maior ativação do receptor do tipo D2 leva à inativação de Akt, reduzindo a quantidade de neurônios GABAérgicos em todo o cérebro e também o comportamento motor (SOUZA e TROPEPE, 2011).

### **1.6 Zebrafish como modelo experimental:**

George Streisinger em 1981, foi o primeiro cientista a utilizar o vertebrado zebrafish, da espécie *Danio rerio* como modelo de análise científica. Desde então passou a ser utilizado para o estudo comportamental, genético e toxicológico (GRUNWALD e EISEN, 2002). O desenvolvimento de seus circuitos neurais no estágio larval é semelhante à organização do cérebro humano no período de desenvolvimento

intrauterino, o que é caracterizado entre o 3º até o 5º dia pós fertilização (dpf) (GAHTAN e BAIER, 2004). Portanto é cada vez maior o uso deste modelo animal como tentativa de analisar as diversas funções genéticas, bioquímicas, morfológicas e comportamentais envolvidas no neurodesenvolvimento.

Seu desenvolvimento é externo, portanto de fácil manipulação no campo genético e farmacológico. Além disso, é possível acompanhar seu desenvolvimento *in vivo*, proporcionando vantagens, por exemplo, na observação da sinalização dopaminérgica e suas vias intracelulares dentro do tecido larval.

### **1.7 Sistema dopaminérgico na larva do zebrafish:**

Os neurônios dopaminérgicos começam a ser produzidos na larva do zebrafish aproximadamente 16 a 24 horas pós a fertilização (hpf). Ele possui os receptores D1, D2, D3 e D4. O receptor do tipo D1, começa a aparecer 30 hpf na parte posterior do cérebro e diencéfalo (THIRUMALAI e CLINE, 2008).

O desenvolvimento dos seus circuitos neurais são semelhantes a organização e o desenvolvimento no cérebro humano durante o período fetal e pós natal (THIRUMALAI e CLINE, 2008). O cérebro do zebrafish possui componentes específicos como as enzimas TH e MAO, a DAT, juntamente com os quatro receptores dopaminérgicos (LAMBERT, BONKOWSKY, MASINO, 2012).

Os neurônios dopaminérgicos estão presentes no hipotálamo, telencéfalo ventral ou subpalio e pretecto (RINK e WILLIMANN, 2002). Até o 5º dpf, os grupos celulares se projetam para o telencéfalo primariamente a partir do diencéfalo (SOUZA e TROPEPE, 2011).

A modulação do comportamento pela sinalização dopaminérgica, em termos de concentração, é complexa porque os aumentos, bem com a diminuição podem muitas vezes resultar em mudanças de comportamento. Por exemplo, há um decréscimo no deslocamento motor quando tratados com antagonistas do receptor D2, sugerindo que a sinalização através do receptor do tipo D2 pode estar envolvido neste comportamento (THIRUMALAI E CLINE, 2008). Experiências semelhantes com 7º dpf mostram que o tratamento com uma substância que bloqueia a degradação da dopamina reduz o movimento (BRETAUD *et al.*, 2007). Assim, parece que estimulando ou bloqueando a via de sinalização da dopamina (por exemplo, antagonistas do receptor D2) tem o mesmo efeito global de redução no movimento das larvas. Estes resultados sugerem um comportamento em forma de U invertido (curva de Kuznets) que é comum a neurotransmissão de dopamina, previamente observado em mamíferos (WILLIAMS e CASTNER, 2006).

## **2. JUSTIFICATIVA:**

Recentes estudos mostram a alteração da sinalização dopaminérgica associada com a manifestação da esquizofrenia (SOUZA *et al.*, 2011). Além das alterações na sinalização dopaminérgica, pacientes esquizofrênicos apresentam alterações no neurodesenvolvimento. Porém, pouco se sabe sobre a interação entre as duas hipóteses, sendo que o foco é sempre sobre o papel da disfunção desenvolvimental na sinalização dopaminérgica, e nunca no papel da DA no neurodesenvolvimento.

Portanto, o presente estudo pretende utilizar o modelo animal da larva de zebrafish para caracterizar a sinalização dopaminérgica no neurodesenvolvimento inicial, e investigar a regulação de possíveis vias intracelulares que participam diretamente nas alterações morfológicas correlacionadas à esquizofrenia.

O entendimento destes mecanismos ajudarão na compreensão da etiologia e, possivelmente no desenvolvimento de ferramentas preventivas.

### **3. OBJETIVOS:**

#### **3.1 Objetivo geral:**

Este projeto tem como objetivo geral analisar o desbalanço na regulação das vias intracelulares dopaminérgicas DARPP-32 e Akt, como base da esquizofrenia, durante o neurodesenvolvimento através da larva do zebrafish.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

São objetivos específicos desse trabalho:

- ✓ Investigar se o receptor D1 aumenta a atividade da via intracelular da DARPP-32 por Western Blot e imunofluorescência.
- ✓ Analisar se o receptor D2 reduz a atividade da via intracelular da DARPP-32 e da Akt por Western Blot e imunofluorescência.
- ✓ Investigar em quais tipos neuronais ocorrem a regulação dessas vias por imunofluorescência.

## **4. MÉTODOS:**

### **4.1 Animais:**

Serão utilizadas larvas do zebrafish no período de 3dpf e 5dpf (dias pós fertilização).

### **4.2 Cruzamento:**

Os peixes serão colocados para cruzamento, após 40min a 60min da última alimentação (este caracterizado como dia 0). São colocados em aquários de 1 Litro e verificados se estão limpos e esterilizados. Na manhã seguinte, os peixes irão se reproduzir a partir do momento em que ficam no ciclo claro. Após duas horas, é observado se houve mesmo a reprodução, os ovos são grandes e visíveis a olho nu. Os ovos fecundados são separados dos não-fecundados (opacos de coloração branca) e os ovos fecundados são colocados em estufas com ciclo de luz claro/escuro (14/10h), na temperatura ideal de 28°C.

As larvas que forem usadas na experimentação nas idades de 3dpf e 5dpf são retiradas para ser feito o tratamento farmacológico e dissecação cerebral.

### **4.3 Procedimento de tratamento farmacológico:**

As larvas serão tratadas farmacologicamente em concentrações específicas com agonista de D1, SKF38393, com antagonista de D1, SCH23390, antagonista de D2, RACLOPRIDA, e agonista de D2, QUINPIROLE, por diferentes períodos de tempo. As

larvas serão tratadas por 10 minutos para a avaliação da via DARPP-32, e por 30 minutos para a avaliação da via Akt.

#### **4.4 Procedimentos de dissecação cerebral:**

Após o tratamento, as larvas serão colocadas no gelo com a substância triclaína para anestesia e, em seguida, terão seus cérebros dissecados e colocados em tampão de lise.

Para o preparo das fatias para imunohistoquímica, as larvas serão anestesiadas com triclaína e, em seguida, fixadas em 4% paraformaldeído.

#### **4.5 Western Blot:**

As amostras de cérebro serão colocadas em tampão de lise com inibidor de protease e de fosfatase, e acondicionadas no freezer -80°C. Em seguida, serão sonificadas e centrifugadas à 40°C para a separação das proteínas. As proteínas serão separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e, em seguida, serão transferidas para uma membrana PVDF.

As membranas serão incubadas em anticorpo 1° específico para proteína fosforilada (DARPP-32 e para AKT) e/ou para proteína total (DARPP-32, AKT e Actina), overnight a 4°C. Em seguida serão incubadas em anticorpo 2° acoplado à peroxidase, e depois reveladas com ECL.



#### **4.6 Imunofluorescência e microscopia confocal:**

Após a fixação em 4% PFA, as amostras serão desidratadas com banhos de sacarose. Em seguida, as amostras serão fatiadas no criostato e colocadas em lâminas. Estas lâminas serão incubadas em anticorpos 1° específicos e em seguida em anticorpos 2° acoplados à proteína fluorescente (GFP ou RFP).

As imagens serão feitas através de microscopia de fluorescência ou microscopia confocal.

#### **4.7 Análise estatística:**

Os resultados serão analisados por teste t-student e/ou ANOVA, e as diferenças serão consideradas estatísticas quando o valor de p for abaixo de 0.05.

**5. CRONOGRAMA:**

<b>ATIVIDADES</b>	<b>1° SEMESTRE</b>	<b>2° SEMESTRE</b>	<b>3° SEMESTRE</b>	<b>4° SEMESTRE</b>
Tratamento com agonistas e antagonistas de receptor D1 e D2 e montagem da curva de concentração	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	
Western Blot	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	
Imunohistoquímica		<b>X</b>	<b>X</b>	
Análise dos resultados		<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
Elaboração da dissertação				<b>X</b>

## 6. REFERÊNCIAS

ALBERT, KATHETINE A.; HEMMINGS, HUGH C.; ANNA, I.B.; ADAMO, RT.; POTKIN, STEVEN G.; AKBATIAN, S.; SANDMAN, CURT A., COTMAN, CARL W.; BUNNEY, WILLIAN E.; GREENGARD, P. **Evidence for decreased DARPP-32 in the Prefrontal cortex of patients with schizophrenia.** (Reprinted) arch gen psychiatry/vol 59, aug 2002.

ARIAS-CARIÓN, O.; STAMELOU, M.; MURILLO-RODRÍGUEZ, E.; MENÉNDEZ-GONZÁLEZ, M.; POPPEL, E. **Dopaminergic reward system: a short integrative review.** International Archives of medicine. V. 3, p. 24-30, 2010.

BARCHAS, J.D., AKIL, H., ELLIOTT, G.R., HOLMAN, R.B., WATSON, S.J. 1978. **Behavioral neurochemistry: neuroregulators and behavioral states.** Science 26,964-973.

BEAULIEU, JM; SOTNIKOVA, TD.; YAO, WD.; KOCKERITZ, L.; WOODGETT, JR.; GAINETDINOV, RR.; CARON, MG. 2004. **Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade.** Proc Natl Acad Sci USA 101:5099 –5104.

BEAULIEU, JEAN-MARTIN; GAINETDINOV, RAUL R.; CARON, MARC G. **The AKT1-GSK3 $\beta$  signaling cascade in the actions of dopamine,** Trends Pharmacol. Sei. (2007), doi: 10:1016/j.tipes.2007.02.006.

BERGSON, C., LEVENSON, R.; GOLDMAN-RAKIC, P.S.; LINDOW, M.S. 2003. **Dopamine receptor-interacting proteins: the Ca(2+) connection in dopamine signaling.** Trends Pharmacol. Sci. 24,486 – 492.

BOEHMLER, W.; CARR, T.; THISSE, C.; THISSE, B.; CANFIELD, V.A.; LEVENSON, R. **D4 Dopamine receptor genes of zebrafish and effects of the antipsychotic clozapine on larval swimming behavior.** Genes, Brain and Behaviour (2007) 6: 155 – 166.

BONCI, ANTONELLO e HOPF, WOODWARD F. **The Dopamine D2 Receptor: New Surprises from an Old Friend**. *Neuron*, Vol 47, 335-338, August 4, 2005.

BRETAUD, S., LI, Q., LOCKWOOD, B.L., KOBAYASHI, K., LIN, E., GUO, S. (2007). **A choice behavior for morphine reveals experience-dependent drug preference and underlying neural substrates in developing larval zebrafish**. *Neuroscience* 146, 1109 – 1116.

CAIRO, CHRISTOPHER W.; SIMON, JOSEF B e GOLAN, DAVID E.S. **Princípios fundamentais da farmacologia**. 3ª edição. Rio de Janeiro. 2014.

CAMPBELL, D.B.; SUTCLIFFE, J.S.; EBERT, P.J.; MILITERNI, R.; BRAVACCIO, C.; TRILLO, S.; ELIA, M.; SCHNEIDER, C.; MELMED, R.; SACCO, R. (2006). **A genetic variant that disrupts MET transcription is associated with autism**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 16834 – 16839.

CHUBB, J.E.; BRADSHAW, N.J.; SOARES, D.C.; PORTEOUS, D.J.; MILLIAR, J.K. (2008). **The DISC locus in psychiatric illness**. *Mol. Psychiatry* 13, 36 – 64.

CONNOR, J.D. 1970. **Caudate nucleus neurones: correlation of the effects of substantia nigra stimulatton with iontophoretic dopamine**. *J Physiol. (London)* 208, 691-703.

COTTER, D., KERWIN, R., AL-SARRAJI, S., BRION, J.P., CHADWICH, A., LOVESTONE, S., ANDERTON, B., e EVERALL, I. 1998. **Abnormalities of Wnt signalling in schizophrenia – evidence for neurodevelopmental abnormality**. *Neuroreport* 9, 1379 – 1383.

EMAMIAN, EFFAT; HALL, DIANA; BIAMBAUM, MORRIS J. KARAYIORGOU; GOGOS, JOSEPH A. **Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3 $\beta$  signaling in schizophrenia**. *Nature genetics* volume 36, number 2, February 2004.

FATEMI, S.H. (2001). **Reelin mutations in mouse and man: from reeler mouse to schizophrenia, mood disorders, autism and lissencephaly**. *Mol. Psychiatry* 6 , 129 – 133.

GAHTAN, E. e BAIER, H. 2004. **Of lasers, mutants, and see-through brains: functional neuroanatomy in zebrafish**. J. Neurobiol. 59, 147 – 161.

GRUNWALD, D.J. e EISEN, J.S. 2002. **Headwaters of the zebrafish emergence of a new learn from zebrafish**. Genes Brain Behav.3, 63-74.

KELLENDONK C., SIMPSON EH., POLAN, HJ. **Transient and selective over expression of dopamine D2 receptors in the striatum causes persistent abnormalities in prefrontal cortex functioning**. Neuron 2006;49:603 615.

KIM, H., KISHIKAWA, S., HIGGINS, A.W., SEONG, I., DONOVAN, D.J., SHEN, Y., LALLY, E., WEISS, L.A., NAJM, J., KUTSCHE, K., et al. (2008). **Disruption of neurexin 1 associated with autism spectrum disorder**. Am. J. Hum. Genet. 82 , 199 – 207.

LAMBERT, ARON M; BONKWSKY, JOSHUA L; MASINO, MARK A. **The conserved dopaminergic diencephalospinal tract mediates vertebrate locomotor development in zebrafish larvae**. The Journal of Neuroscience, September 26, 2012. 32(39):13488 –13500.

MA, P. M. e LOPEZ, M. 2003. Catecholaminergic systems in the zebrafish. IV. **Organization and projection pattern of dopaminergic neurons in the diencephalon**. J Comp Neurol 460, 13–37.

MIGUEL, MARINA PACHECO; MENEZES, LILIANA BORGES DE e ARAÚJO, EUGÊNIO GONÇALVES DE. **Western Blotting: A técnica e aplicações na pesquisa e rotina diagnóstica em medicina veterinária**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p. 1704. 2012.

MONTEIRO, MARIANA RAQUEL; KANDRATAVICIUS, LUDMYLA; LEITE, JOÃO PEREIRA. **O papel das proteínas do citoesqueleto na fisiologia celular normal e em condições patológicas**. J Epilepsy Clin Neurophysiol 2011;17(1):17-23. Received Jan. 20, 2011; accepted Feb. 18, 2011.

MOORE, R. Y. BLOOM, E. E. **Central cotecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the dopamine systems**. Neuroscie. 1978. 1:129-69.

MUGLIA, P., VICENT, A.M., VERGA, M., KING, N., MACCIARDI, F., KENNEDY, J.L. (2003). **Association between the BDNF gene and schizophrenia**. *Mol. Psychiatry* 8, 146 – 147.

MUSER, K.T. e MCGURK, S.R. 2004. **Schizophrenia**. *Lancet* 363, 2063 – 2072.

NEVE, K.A., SEAMANS, J.K. e TRANTHAM-DAVIDSON, H. 2004. **Recept. Signal Transduct.** *Res.* 24, 165–205.

NIWA, M., KAMIYA, A., MURAI, R., KUBO, K., GRUBER, A.J., TOMITA, K., LU, L., TOMISATO, S., JAARO-PELED, H., SESHADRI, S.,. (2010). **Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer disturbs postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and leads to adult behavioral deficits**. *Neuron* 65, 480 – 489.

PAGANO, M. **Application of electrophoresis and related methods, such as western blotting and zymography to the study of some proteins and enzymes**. *Analytica Chimica Acta*. Amsterdam. v.383, p.119-125, 1999.

PINHEIRO, MARTA. **Fundamentos de neuropsicologia – O desenvolvimento cerebral da criança**. *Vita et Sanitas*, Trindade/Go, v.1, n. 01, 2007.

POST, R.M. (2007). **Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: clinical and theoretical implications**. *J. Psychiatr. Res.* 41,979 – 990.

RINK, ELKE e WULLIMANN, MARIO F. **Connections of the ventral telencephalon and tyrosine hydroxylase distribution in the zebrafish brain (Danio rerio) lead to identification of an ascending dopaminergic system in a teleost**. *Brain Research Bulletin*, vol. 57, Nos. 3/4 , pp. 385-387, 2002.

RINK, ELKE e WULLIMANN, MARIO F. **The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum)**. *Brain Research Institute*. (2001) 316-330.

SCHAMBRA, UB.; DUNCAN, GE.; BREESE, GR.; FORNARETTO, MG.; CARON, MG.; FREMEAU, RT Jr. 1994 **Ontogeny of D1A and D2 dopamine receptor subtypes in rat brain using in situ hybridization and receptor binding**. *Neuroscience* 62:65–85.

SEEMAN, P.; WEINSHENKER, D.; QUIRON, R.; SRIVASTAVA, L.K.; BHARDWAJ, S.K.; GRANDY, D.K.; PREMONTE, R.T., SOTNIKOVA, T.D.; BOKSA, P.; EL-GHUNDI, M. 2005. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 3513–3518.

SHIROKAWA, ITIRO. **Aspectos gerais do manejo do tratamento de pacientes com esquizofrenia.** *Rev. Bras. Psiquiatr.*[online]. 2000, vol.22, suppl.1, pp. 56-58. ISSN 1516-4446.

SILLIVAN, S.E. e KONRADI, C. **Expression and function of dopamine receptors in the developing medial frontal cortex and striatum of the rat,** *Neurosciense* (2011), doi: 10. 1016/j.neurosciense. 2011.10.004.

SILVA, REGINA CLÁUDIA BARGOSA DA. **Esquizofrenia: uma revisão.** *Psicologia USP*, 2006, 17(4), 263-285.

SOUZA, BRUNO REZENDE; ROMANO-SILVA, MARCO AURÉRIO; TROPEPE, VICENTE. **Dopamine D2 Receptor Activity Modulates AKT Signaling and Alters GABAergic Neuron Development and Motor Behavior in Zebrafish larvae.** *The Journal of Neuroscience*, April 6, 2011. 31(14): 5512-5525.

SQUASSINA, A., PICCARDI, P., DEL ZOMPO, M., ROSSI, A., VITA, A., PINI, S., MUCCI, A., GALDERISI, S. (2010). **NRG1 and BDNF genes in schizophrenia: an association study in an Italian case-control sample.** *Psychiatry Res.* 176, 82 – 84.

STANDAERT, DAVID G. e GALANTER, JOSHUA M. **Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica.** 4ª edição. Ano 2008. Cap.12. Pg 166 a 185.

STEFAN LEUCHT, MD; CHRISTOPH U.; CORRELL, MD; RENE, S; KAHN, MD. 2012. **Research directions in schizophrenia treatment: mechanisms of action for next-generation agents.** Faculty and Disclosures. Medscape multispecialty. CME 10/13/2012.

THIRUMALAI, VATSALA e CLINE, HOLLIS T. **Endogenous Dopamine Suppresses Initiation of Swimming in Prefeefing Zebrafish Larvae.** *J Neurophysiol* 100: 1635-1648, 2008.

VAN TOL, H. H.; BUNZOW, J. R.; GUAN, H. C.; SUNAHARA, R. K.; SEEMAN, P.; NIZNIK, H. B. e CIVELLI, O. 1991. **Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine.** Nature 350, 610–4.

VESTERBERG, O. **A short history of electrophoretic methods.** Electrophoresis. Weinheim. v.14, n.12, p.1243-1249, 1993.

VICENT, A.M., MACCIARDI, F., VERGA, M., BASSETT, A.S., HONER, W.G., BEAN, G., KENNEDY, J.L. (1997). **NCAM and schizophrenia: genetic studies.** Mol. Psychiatry 2, 65 – 69.

WEI, J. e HEMMING, G.P. 2000. **The NOTCH4 locus is associated with susceptibility to schizophrenia.** Nat. Genet. 25, 376 – 377.

WILLIAMS, G.V.; CASTNER, S.A. (2006). **Under the curve: critical issues for elucidating D1 receptor function in working memory.** Neuroscience 139, 263 – 276.