

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Neurociências

ANA CAROLINA MONTEIRO DE SOUZA LIMA

**Resposta motora em larvas de Zebrafish expostas previamente
à um tratamento crônico com dopamina**

Belo Horizonte

2016

ANA CAROLINA MONTEIRO DE SOUZA LIMA

**Resposta motora em larvas de Zebrafish expostas previamente
à um tratamento crônico com dopamina**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Neurociências do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas
Gerais, como parte dos requisitos
para obtenção do Título de Mestre
em Neurociência.

Área de concentração: Neurociências Básica

Orientador: Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza

BELO HORIZONTE

2016

043

Lima, Ana Carolina Monteiro de Souza.

Resposta motora em larvas de Zebrafish expostas previamente à um tratamento crônico com dopamina [manuscrito] / Ana Carolina Monteiro de Souza Lima. - 2016.

68 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Dopamina - Teses. 2. Sistema dopaminérgico - Teses. 3. Zebra danio. 4. Comportamento motor. 5. Neurociências - Teses. I. Souza, Bruno Rezende de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612.8

“No Gods Or Kings. Only Man.”

Andrew Ryan (Bioshock)

AGRADECIMENTOS

A minha família, pelo suporte de uma vida inteira. Especialmente à minha mãe, que me deu todo tipo de apoio que poderia precisar em todos momentos dessa jornada e que sem ela não seria possível. Aos meus amigos verdadeiros, que me ajudaram com as gargalhadas, conselhos, estímulos e companheirismo. Todos foram de exímia importância nesse percurso.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Bruno Rezende de Souza, pela oportunidade, conselhos, compreensão, gargalhadas e amizade. Meu agradecimento em especial pelo voto de confiança dado há dois anos, e por me guiar através dos caminhos científicos, sempre iluminando o percurso com sua empolgação inerente. Por acreditar e me encorajar consistentemente.

Aos colegas do Núcleo de Neurociências (NNC), que dia após dia me ensinavam lições as quais pude aplicar a todos segmentos da vida e que jamais serão esquecidas. Especialmente agradeço à Ana Luiza Reis, Lorena Matos, Laura Jaimes, Ana Raquel Caixeta e Leonardo Guarnieri que vivenciaram todos os momentos dessa montanha-russa intelectual, me dando apoio nos momentos difíceis e enriquecendo ainda mais os momentos alegres. Ao Flávio Mourão do NNC pela ajuda nos conhecimentos de elétrica. E aos colegas do INCT-MM Erika Sacramento, Kevin Alvarenga e Larissa de Oliveira por todo o auxílio que proporcionaram.

Aos professores do NNC, Prof. André Ricardo Massenssini, Prof. Marcio Moraes, Profa. Grace Schenatto e Profa. Juliana Tavares, pela estrutura, estímulo e exemplo que exibem em seus cargos o que proporcionou uma ineqüiparável inspiração profissional.

E por fim agradeço a todos que passaram pela minha vida e deixaram suas marcas na minha vida e me ensinaram todos tipos de lições que serão eternamente valiosas.

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT DEPOIS ALTERAR DO PORTUGUES PRO INGLES	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Dopamina.....	12
1.1.1. Receptores dopaminérgicos	13
1.1.2. Vias dopaminérgicas.....	16
1.1.3.. Dopamina no Neurodesenvolvimento	17
1.2. O Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) como modelo experimental.....	18
1.2.1. Sistema dopaminérgico no zebrafish	20
1.2.2. Vias dopaminérgicas em zebrafish	21
1.2.3. Sinalização dopaminérgica em zebrafish.....	23
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	25
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Cuidados Gerais com zebrafish	27
4.1.1 Manutenção do Sistema zebrafish.....	27
4.1.2 Origem das Matrizes de <i>Danio rerio</i>	28
4.1.3 Reprodução	28
4.1.4 Crescimento dos Embriões	29
4.1.5 Alimentação	29
4.1.6 Eutanásia dos Animais	29
4.2. Fármacos Utilizados.....	30
4.3. Tratamentos Farmacológicos.....	30
4.3.1 Tratamento crônico	30
4.3.2 Desafios farmacológicos.....	31
4.3.3 Divisão dos Grupos.....	31
4.4. Testes Comportamentais	32

4.5. Análise estatística	33
5. RESULTADOS	34
5.1. 5.1. Efeito dos tratamentos sobre a distância percorrida de larvas com 5, 7 e 14dpf	34
5.2. Efeito dos tratamentos sobre a velocidade média de larvas com 5, 7 e 14dpf	38
5.3. Efeito dos tratamentos sobre o tempo móvel de larvas com 5, 7 e 14dpf	41
5.4. Efeito dos tratamentos sobre os episódios de movimento de larvas com 5, 7 e 14dpf	44
5.5. Relação entre tempo em movimento por episódios de movimento nas larvas com 5, 7 e 14dpf	47
5.6. Relação entre distância percorrida e número de episódios de movimento nas larvas com 5, 7 e 14dpf	50
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÃO	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cascata de sinalização intracelular após a ativação dos receptores dopaminérgicos.	15
Figura 2: Vias dopaminérgicas no cérebro humano	17
Figura 3: Comparação entre encéfalos invaginados e invertidos	20
Figura 4: Grupos catecolaminérgicos em uma larva com 4dpf.....	21
Figura 5: Padrões das projeções dopaminérgicas no cérebro de uma larva de Zebrafish com 4dpf.....	22
Figura 6: Desenho experimental.	33
Figura 7: Distância percorrida (m) por larvas com 5, 7 e 14dpf, durante os primeiros 5 e 30 minutos de desafio com dopamina, SKF-38393 ou quinpirole.....	40
Figura 8: Velocidade média (m/s) por larvas com 5, 7 e 14dpf nos primeiros 5 e 30 minutos de desafio com dopamina, SKF-38393 ou quinpirole.....	46
Figura 9: Tempo móvel (s) por larvas com 5, 7 e 14dpf nos primeiros 5 e 30 minutos de desafio com dopamina, SKF-38393 ou quinpirole.....	41
Figura 10: Episódios de movimento por larvas com 5, 7 e 14dpf nos primeiros 5 e 30 minutos de desafio com dopamina, SKF-38393 ou quinpirole.....	57
Figura 11: Relação entre tempo móvel e episódios de movimento em larvas com 5, 7 e 14dpf nos primeiros 5 e 30 minutos de desafio com dopamina, SKF-38393 ou quinpirole.....	61
Figura 12: Relação entre distância percorrida e episódios de movimento em larvas com 5, 7 e 14dpf nos primeiros 5 e 30 minutos de desafio com dopamina, SKF-38393 ou quinpirole.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fármacos utilizados nos experimentos com larvas de zebrafish. 30

Tabela 2: Nomes dos grupos e qual tratamento foram submetidos..... 32

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA = 6-hydroxydopamina

AADC = aminoácido aromático descarboxilase

Ac= Adenilato ciclase

AKT= Proteína Kinase B

ATV = área tegmental ventral

cAMP = Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

DAT = Transportador de dopamina

dpf = Dias pós fertilização

DC = Diencéfalo ventral

GSK3- β = Glicogênio Kinase Sintase 3 β

hpf = Horas pós fertilização

L-DOPA = 1-3,4-diidroxifenilalanina ou levodopa

MAO = monoamina oxidases

MPTP = 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

pH = Potencial hidrogeniônico

PKA = Proteína quinase A

PP2A = Proteína fosfatase – 2A

SN = substância nigra pars compacta

TDAH= Transtorno do déficit de atenção e hiperatividade

TH = Tirosina hidroxilase

Thr-34 = Treonina 34

Thr-75 = Treonina 75

Thr-308 = Treonina 308

RESUMO

Os estágios iniciais do neurodesenvolvimento são cruciais para o desenvolvimento normal do cérebro. Alterações nele causam alterações fisiológicas e comportamentais na vida adulta, associadas a esquizofrenia e o transtorno do déficit de atenção e hiperatividade (TDAH). Ambas doenças apresentam alterações dopaminérgicas. Sabe-se que a maquinaria dopaminérgica está expressa já nos estágios iniciais do desenvolvimento. Portanto é importante a elaboração de modelos para a compreensão das bases desenvolvimentais destas etiologias. O zebrafish vem crescendo como um forte modelo experimental devido a sua grande semelhança genética com humanos, desenvolvimento externo e fácil manipulação farmacológica. Para testarmos a nossa hipótese de que a dopamina tem papel no desenvolvimento do comportamento motor, utilizamos o zebrafish como modelo experimental. No trabalho anterior do grupo, foi demonstrado que um tratamento crônico na janela desenvolvimental do 3-5 dia pós-fertilização (dpf), gera consequências nas larvas. Aqui, tivemos como objetivo investigar se as alterações comportamentais motoras e a resposta comportamental dopaminérgica, causadas pelo aumento dos níveis dopaminérgicos, na mesma janela desenvolvimental do trabalho anterior, são sustentadas em larvas em idades mais avançadas. Larvas de foram submetidas a um tratamento crônico com dopamina durante o 3^o ao 5^o dpf e, nas idades de 5, 7 e 14dpf foram analisadas para avaliar seu desempenho motor, com e sem desafio adicional de dopamina, SKF-38393 ou quinpirole. Em cada idade foram realizadas análises de distância percorrida, velocidade média, tempo móvel e episódios de movimento durante 5 e 30 minutos a fim de inferir a influência da sinalização da DARPP-32 e da Akt, respectivamente. Todas as análises foram feitas pelo software ANY-maze. Em nossos resultados, foi possível concluir que: 1) o aumento de dopamina entre 3-5 dpf altera a locomoção das larvas; 2) a alteração de alguns dos parâmetros motores se sustentam até idades mais avançadas; 3) os comportamentos analisados com 30 minutos apresentavam maiores diferenças, sugerindo que a sinalização pela via da Akt é a mais afetada pelo tratamento crônico com dopamina. Foi possível concluir que a sinalização dopaminérgica tem papel no desenvolvimento da atividade locomotora da larva do zebrafish.

ABSTRACT

The early stages of neurodevelopment are crucial to the normal development of the brain. Alterations during neurodevelopment can lead to behavioral and physiological alterations in adult life, which can be associated to schizophrenia and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). Both schizophrenia and ADHD present changes in dopaminergic signaling and development. It is known that dopaminergic system is expressed early in neurodevelopment. This way, it is important to establish models for the understanding of the bases of these etiologies. The zebrafish has been growing as a strong experimental model due to your relative similarity to humans, external development and easy pharmacological manipulation. To test if our hypothesis that dopamine has role on the development of motor behavior, we used zebrafish as our experimental model. Our work had the objective to investigate if the motor behavior alterations and the dopaminergic behavioral response, caused by the increase of the dopamine levels on the developmental window between the 3rd and 5 day post fertilization (dpf), are sustained in larvae in advanced age. Zebrafish larvae were chronically treated from the 3rd to 5 dpf and, at the ages of 5, 7 and 14dpf they were analyzed to evaluate their motor behavior, with and without additional pharmacological challenge with dopamine, SKF-38393 or quinpirole. We analyzed distance travelled, mean speed, time mobile and mobile episodes during 5 and 30 minutes with the intention of implying the influence of DARPP-32 and Akt signaling, respectively. In our results, it was possible to conclude that: 1) the increase of dopamine between 3-5dpf alters the locomotion of larvae; 2) the alteration of some motor parameters is sustained until advanced ages; 3) the main behavioral alterations occurred during 30 minutes analyzes, suggesting that the signalization by the Akt pathway is more affect by the chronic treatment with dopamine. It was possible to conclude that the dopaminergic signaling has a role on the development of the locomotor activity of the zebrafish larvae.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dopamina

Em agosto de 1957 Kathleen Montagu foi pioneira em provar a existência da dopamina em um cérebro humano completo (MONTAGU, 1957). Logo em seguida, Arvid Carlsson e colaboradores identificaram a existência do neurotransmissor dopamina em modelos animais (CARLSSON *et al.*, 1958).

Sabe-se hoje que a dopamina é responsável pela regulação de diversas funções no sistema nervoso central como o movimento voluntário, alimentação, afeição, recompensa, sono, atenção, memória de trabalho e aprendizado. Já no sistema nervoso periférico a dopamina é extremamente importante na regulação da olfação, processos da retina, regulação hormonal, funções cardiovasculares, regulação simpática, sistema imune entre outras. Uma vez que esse neurotransmissor é associado a diversas funções, é previsível que seu mal funcionamento acarrete em vários transtornos. Dentre eles ressalta-se a doença de Parkinson, os vícios e a esquizofrenia (BEAULIEU, J.-M.; GAINETDINOV, 2011; IVERSEN; IVERSEN, 2007; MISSALE *et al.*, 1998).

A dopamina é um neurotransmissor pertencente ao grupo das catecolaminas, as quais são constituídas por um grupo catecol conectado a um grupo amina. Como precursor dessa cadeia temos o aminoácido neutro tirosina, que pode ser obtido através da dieta ou da produção endógena pelo fígado a partir da fenilalanina. A tirosina é em seguida convertida em L-DOPA (1-3,4-diidroxifenilalanina ou levodopa), pela enzima tirosina hidroxilase (TH), sendo essa a etapa que controla a velocidade de produção da dopamina, nos neurônios dopaminérgicos e de todas outras catecolaminas em seus respectivos neurônios. A dopamina, por fim, é alcançada pela ação da enzima aminoácido aromático descarboxilase (AADC) (BLASCHKO, 1942; HOLTZ, 1939).

1.1.1. Receptores dopaminérgicos

Uma vez liberada na fenda sináptica pelos neurônios pré-sinápticos, a dopamina ativa os receptores dopaminérgicos metabotrópicos no neurônio pós-sináptico, os quais, nos humanos, são nominados de D1 a D5. Estes receptores são então divididos em duas famílias: D1 e D2, sendo essa divisão feita a partir de suas propriedades farmacológicas e da relação dessas famílias com a modulação da enzima adenilato ciclase (AC). Esta enzima é a responsável pela modulação da adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) que controla outras fases da cascata (KEBABIAN; CALNE, 1979).

A família D1 é composta pelos receptores D1 e D5, e esses possuem diferentes distribuições pelo cérebro, sendo ambos encontrados em terminais pós-sinápticos. O receptor D1 é encontrado com alta densidade nas áreas nigroestriatais, mesolímbica e mesocorticais (MISSALE *et al.*, 1998). Já o receptor D5 tem uma maior afinidade com a dopamina que o D1 (SUNAHARA *et al.*, 1991) mas possui uma menor densidade cerebral, estando espalhado em diferentes regiões como o córtex pré-frontal, córtex pré-motor, córtex entorrinal, córtex cingulado, substância negra, hipotálamo, hipocampo e giro denteado. Independentemente de sua distribuição, ambos possuem uma conformação estrutural bioquímica altamente similar, pois têm o terceiro loop citoplasmático curto e uma grande cauda C-terminal (MISSALE *et al.*, 1998). Assemelham-se bioquimicamente, uma vez que ambos estão acoplados à proteína G estimulatória (G_s), e aumentam a produção de cAMP através da estimulação da AC (KEBABIAN; GREENGARD, 1971). O cAMP então ativa a proteína quinase A (PKA), a qual modula substratos específicos, como a proteína de 32 kilodaltons regulada pelo cAMP e pela dopamina, a DARPP-32. Esta é uma fosfoproteína multifuncional, predominantemente expressada no estriado, e de extrema importância na mediação bioquímica e nos efeitos comportamentais regulados pela dopamina (SVENNINGSSON *et al.*, 2004). Quando a DARPP-32 é fosforilada no resíduo treonina 34 (Thr-34), torna-se um forte inibidor da proteína fosfatase 1 (PP1) (HEMMINGS *et al.*, 1984). Mas se essa fosforilação for feita no resíduo treonina 75 (Thr-75), ela torna-se uma inibidora da PKA (BIBB *et al.*, 1999). A estimulação dos receptores dopaminérgicos da família D1 resultam no aumento da fosforilação de DARPP-32 através da atividade de PKA, e a ativação

de receptores D2 reduz essa fosforilação pela inibição da atividade de PKA (BATEUP *et al.*, 2008).

A família D2, composta pelos receptores D2, D3 e D4, possui altos níveis de distribuição no estriado, núcleo accumbens e tubérculo olfatório. Em níveis menores, estes receptores também são encontrados na substância negra, área tegmental ventral, hipotálamo, áreas corticais, septum, amígdala e hipocampo (MISSALE *et al.*, 1998; SEEMAN, 2006). É válido salientar que o receptor D3 possui uma área de distribuição mais restrita às áreas límbicas (MISSALE *et al.*, 1998; SOKOLOFF *et al.*, 2006), e o receptor D4, que possui menor níveis de expressão, está presente no córtex frontal, amígdala, hipocampo, hipotálamo, globo pálido, substância nigra pars reticulata e tálamo (MISSALE *et al.*, 1998; RONDOU; HAEGEMAN; VAN CRAENENBROECK, 2010). Estes receptores apresentam o terceiro loop citoplasmático longo e uma cauda C-terminal curta, o oposto do visto com os receptores da família D1 (MISSALE *et al.*, 1998). Bioquimicamente, os receptores dessa família conectam-se a proteína G inibitória (G_i) (FIG.1) e isso inibe a atividade do AC. Além disso, os receptores D2 e D3 são expressos tanto nos terminais pré-sinápticos como nos pós-sinápticos (DE MEI *et al.*, 2009; SOKOLOFF *et al.*, 2006). A cascata de sinalização dos receptores da família D2 é similar a já descrita para a família D1, a diferença reside no fato que com a ativação dos receptores D2, há a redução da fosforilação de DARPP-32 no resíduo Thr-34 (BATEUP *et al.*, 2008).

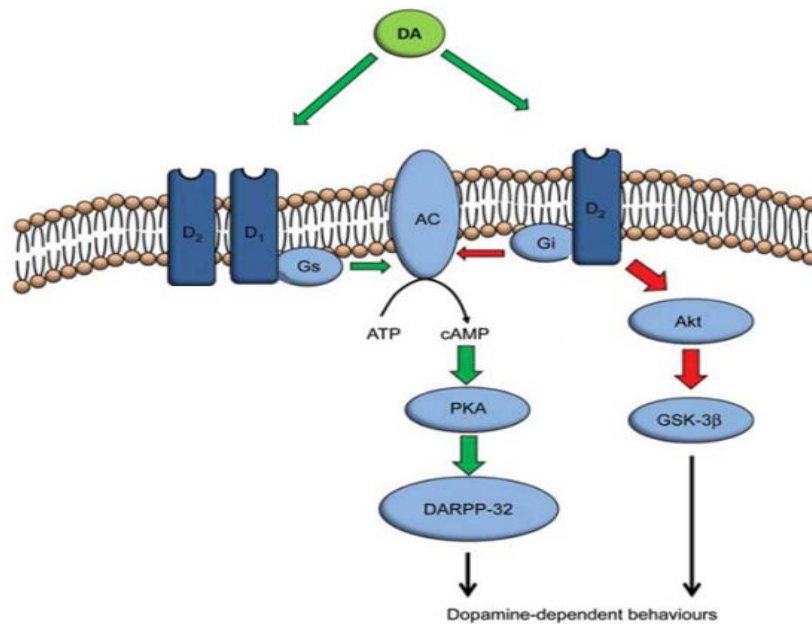


Figura 1: Cascata de sinalização intracelular após a ativação dos receptores dopaminérgicos. Adaptado de Souza & Tropepe, 2011.

A partir dessas informações é necessário ressaltar que o tempo para a realização da fosforilação DARPP-32 e da Akt, que é quando suas formas se tornam ativas, é diferente. A DARPP-32 demora cerca de 5 minutos (Yger & Girault, 2011) enquanto a Akt demora cerca de 30 minutos (Beaulieu et al., 2005). Assim, é possível inferir diferentes resultados para diferentes tempos a partir dessa informação.

Além da sinalização mediada por cAMP, estudos *in vivo* demonstraram que os receptores da família D2, realizam uma sinalização independente por meio do complexo sinalizador composto pela proteína quinase B (Akt), β -arrestina 2 e proteína fosfatase - 2 (PP2A) (BEAULIEU, J. M. *et al.*, 2005; BEAULIEU, J.-M. *et al.*, 2004). Com a ativação do receptor D2 esse complexo é formado e a Akt é inativada, a partir da desfosforilação do seu sítio de ligação treonina 308 (Thr-308) (BEAULIEU, J. M. *et al.*, 2005), aumentando a atividade do glicogênio sintase quinase 3 β (GSK-3 β) a qual favorece a expressão de comportamentos associados à dopamina (BEAULIEU, J.-M. *et al.*, 2004). Foi demonstrado que o excesso de dopamina extracelular leva a inibição da Akt e consequente ativação da GSK-3 β (BEAULIEU, J.-M. *et al.*, 2004; JONES *et al.*, 1998), sendo essa

característica observada em pacientes com esquizofrenia (BEAULIEU, J.-M. *et al.*, 2007). Sabe-se também que antipsicóticos antagonistas de D2, como o haloperidol, ativam a Akt e inibem a GSK-3 β (EMAMIAN *et al.*, 2004). Devido a estudos recentes, essa via vem sendo associada a transtornos psiquiátricos e tratamento para os mesmos, especialmente em relação à esquizofrenia (BEAULIEU, J. M. *et al.*, 2005; BEAULIEU, J.-M. *et al.*, 2004; EMAMIAN *et al.*, 2004; GOULD; MANJI, 2005; LI *et al.*, 2007). Várias drogas são utilizadas para ativar receptores específicos D1 e D2 como o SKF-3839 que é um agonista para D1 e o quinpirole que é agonista para D2 e D3.

1.1.2. Vias dopaminérgicas

Existem quatro vias dopaminérgicas no cérebro (FIG. 2): (1) a via nigroestriatal, na qual neurônios dopaminérgicos localizados na substância nigra pars compacta (SN) enviam projeções axonais para o estriado dorsal, sendo responsável pela modulação do movimento voluntário (DUNNETT, 2005); (2) a via mesolímbica, onde neurônios localizados na parte lateral da área tegmental ventral (ATV) projetam-se para o núcleo accumbens e é relacionada a comportamentos de recompensa e aditivos (BENTIVOGLIO; MORELLI, 2005); (3) a via mesocortical, a qual conecta neurônios dopaminérgicos na ATV ao neocórtex, em primatas (BENTIVOGLIO; MORELLI, 2005; BJÖRKLUND; DUNNETT, 2007) e é relacionada a modulação de processos cognitivos como a memória de trabalho e motivação (HURD; HALL, 2005); e, por fim, (4) a via tuberoinfundibular, que conecta o núcleo infundibular à eminência mediana da glândula pituitária, sendo responsável pela regulação da secreção de prolactina pela glândula pituitária anterior e na modulação do sistema imune (KAVELAARS *et al.*, 2005; LYONS; HELLYSAZ; BROBERGER, 2012; REIS *et al.*, 2009). É importante ressaltar que mesmo que estas vias possuam funções distintas, seus circuitos, projeções e células são conectadas e misturadas, o que faz dessas vias um sistema complexo e altamente interligado (BJÖRKLUND; DUNNETT, 2007).

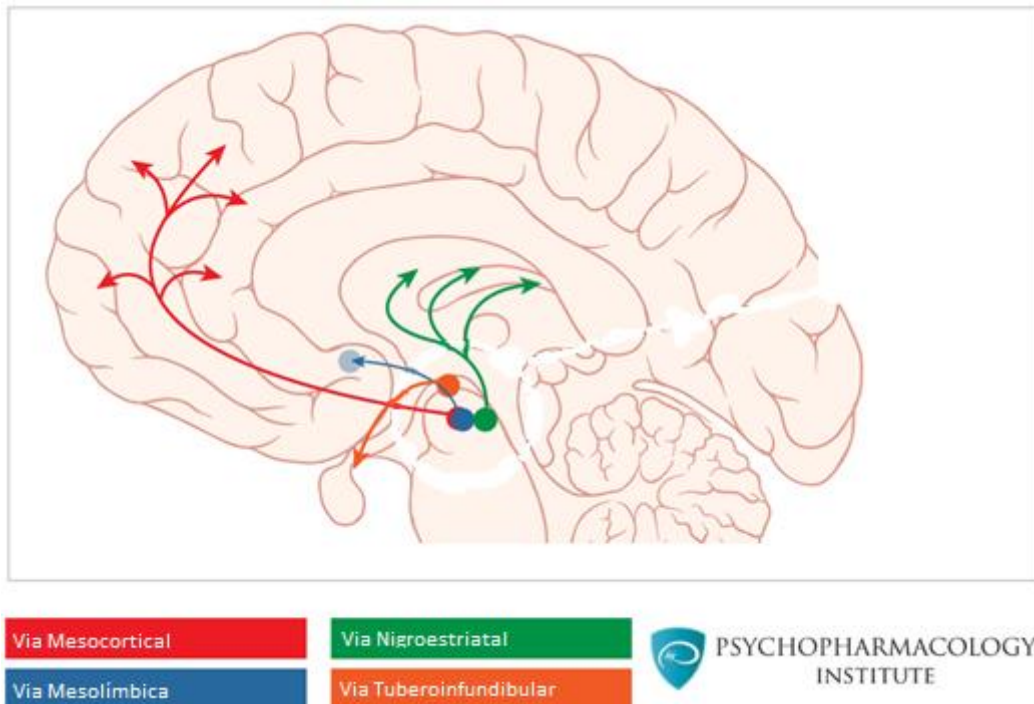


Figura 2: Vias dopaminérgicas no cérebro humano. Adaptado de Psychopharmacology Institute - First-Generation Antipsychotics: An Introduction <http://psychopharmacologyinstitute.com/antipsychotics/first-generation-antipsychotics/>

1.1.3.. Dopamina no Neurodesenvolvimento

O desenvolvimento cerebral é resultado de interações genéticas e ambientais e alterações em algum desses fatores são capazes de modificar, em fases sensíveis, a estrutura neuronal, função, formação e maturação de sinapses, diferenciação e migração celular e a formação de redes neuronais e circuitos (MONEY; STANWOOD, 2013). Vários neurotransmissores, inclusive a dopamina, são expressos antes da sinaptogênese e a ativação de seus respectivos receptores durante o desenvolvimento, pode gerar as alterações citadas anteriormente (LAVDAS *et al.*, 1997; LOTURCO *et al.*, 1995; SCHMIDT *et al.*, 1996; SPENCER; KLUMPERMAN; SYED, 1998) e consequentes alterações comportamentais. A dopamina é um dos primeiros neurotransmissores expressos, sendo expressa no 12º dia do desenvolvimento do cérebro de ratos (DIAZ *et al.*, 1997; JUNG; BENNETT, 1996; SHEARMAN; ZEITZER; WEAVER, 1997), entre 6-8 semanas em fetos humanos (SUNDSTROM *et al.*, 1993) e nas primeiras 24 horas do desenvolvimento do

zebrafish (HOLZSCHUH, 2001; MCLEAN; FETCHO, 2004; SCHWEITZER *et al.*, 2011).

Especificamente a influência dopaminérgica no neurodesenvolvimento é passível de observação por diversas maneiras. Por exemplo, alterações dopaminérgicas realizadas no telencéfalo de embriões de camundongos, altera a migração de neurônios GABAérgicos no cérebro (CRANDALL *et al.*, 2007). A dopamina também pode influenciar a proliferação e diferenciação de células precursoras no telencéfalo de embriões de camundongos e de maneiras diferentes, dependendo da ativação de receptores D1 ou D2 (POPOLO; MCCARTHY; BHIDE, 2005).

Apesar de se manifestar cedo, somente na vida adulta a maturação dos neurônios dopaminérgicos é concluída (MONEY; STANWOOD, 2013). Dessa forma, existem várias janelas desenvolvimentais que, se perturbadas, são capazes de alterar a neurogênese, migração e diferenciação de populações específicas de neurônios as quais são associadas a transtornos psiquiátricos como o autismo (LANGEN *et al.*, 2012), esquizofrenia (BENES, 2000; HOWES; KAPUR, 2009; INSEL, 2010) e a adição (NUTT *et al.*, 2015). Essas doenças possuem por si um enorme impacto na sociedade, em termos sociais e econômicos (ANDLIN-SOBOCKI; REHM, 2005; CHONG *et al.*, 2016; LAVELLE *et al.*, 2014). Ao compreender melhor suas origens e ramificações através de estudos, é fornecida uma sólida base para trabalhar estratégias preventivas e tratamentos que melhorem a qualidade de vida de todos os envolvidos.

1.2. O Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo experimental

No meio científico, existem vários modelos animais para experimentação em estudo biomédicos. O camundongo (*Mus musculus*) é o modelo que possui a maior utilização experimental, devido sua proximidade evolutiva dos humanos. Entretanto, vários outros modelos existem e devem ser ressaltados, como o nematódeo (*Caenorhabditis elegans*), a mosca-das-frutas (*Drosophila melanogaster*) e o teleósteo Zebrafish (*Danio rerio*), sendo esse um dos modelos

que vem ganhando progressivo espaço na pesquisa biomédica (DOOLEY, 2000; SHIN; FISHMAN, 2002). O zebrafish tem sido especialmente utilizado em estudos neurodesenvolvimentais devido à sua reprodução externa, a relativa simplicidade de seus circuitos, número de células neurais (FRIEDRICH; JACOBSON; ZHU, 2010) conservação evolutiva e transparência das larvas (STEWART *et al.*, 2014).

O Zebrafish é um pequeno peixe de água doce, raramente excedendo 40mm, e nativo da região do Himalaia. George Streisinger foi o pioneiro na experimentação com esse peixe na década de 70 e, desde lá, sua utilização vem crescendo em áreas da ciência como a genética, neurofisiologia e biologia do desenvolvimento (SPENCE *et al.*, 2008). Essa progressão deve-se ao fato de ter altas taxas de reprodução e rápido desenvolvimento, de realizar fertilização externa, de possuir uma alta homologia genética com humanos (70%) e de ter um custo de manutenção relativamente baixo. Apesar da aparente simplicidade, o zebrafish exibe uma gama de comportamentos complexos passíveis de análise o que enriquece ainda mais o modelo experimental. Dentre esses comportamentos, podemos citar a capacidade de formar cardumes, explorar ambientes, exibir agressão, dominância, tigmotaxia, esquiva e ansiedade (STEWART *et al.*, 2014).

A arquitetura bruta da maioria das áreas do cérebro do zebrafish é conservada em relação aos demais vertebrados, como a retina, bulbo olfatório, cerebelo e o cordão espinhal, mas a estrutura do telencéfalo possui algumas diferenças pronunciadas (FRIEDRICH; JACOBSON; ZHU, 2010). A maioria dos vertebrados possui o telencéfalo invaginado, com exceção da subclasse *Actinopterygii* (*Danio rerio*) e dos celacantos, que possuem o telencéfalo invertido (JR., 1995) (FIG. 3).

O zebrafish possui dois hemisférios sólidos separados por um ventrículo com a forma de um T, enquanto nos outros vertebrados os hemisférios são ocos com um ventrículo lateral inflado (FOLGUEIRA *et al.*, 2012). Seu telencéfalo possui uma parte ventral e dorsal as quais correspondem, respectivamente, ao subpallium (estriado, pallidum e domínio pallidal-septal) (GANZ *et al.*, 2012;

MUELLER; WULLIMANN; GUO, 2008) e ao pálio (estruturas corticais) (GANZ *et al.*, 2014; VON TROTHA; VERNIER; BALLY-CUIF, 2014).

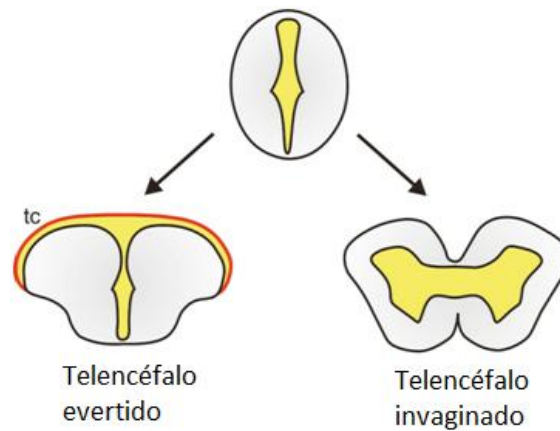


Figura 3: Comparação entre encéfalos invaginados e invertidos. tc: tela choroidea, tecido que produz o líquido cefalorraquidiano, em vermelho. Em amarelo os ventrículos. Adaptado de Gage (1893) por Folgueira e Wilson em <https://www.ucl.ac.uk/zebrafish-group/outreach/summaries/folgueira1/>

1.2.1. Sistema dopaminérgico no zebrafish

A descrição do sistema dopaminérgico, formação e distribuição no Zebrafish já foi estudada por diversas técnicas diferentes, como imunohistoquímica para TH, análise da expressão do gene *th* e marcação de transportador de dopamina (*dat*) (SCHWEITZER *et al.*, 2011). Os primeiros neurônios dopaminérgicos são identificados entre 16-24hpf e, com 3dpf, a maioria dos grupos dopaminérgicos existentes no adulto já está presente nas larvas (HOLZSCHUH, 2001; MCLEAN; FETCHO, 2004; SCHWEITZER *et al.*, 2011). A nomenclatura atual dos neurônios dopaminérgicos é feita pela região anatômica em que o grupo está localizado no prosencéfalo, a exceção é feita com os grupos do diencéfalo ventral (DC) que recebem a nomenclatura de 1-7 de acordo com sua morfologia e posição do eixo rostral-caudal (FIG. 4) (RINK; WULLIMANN, 2002).

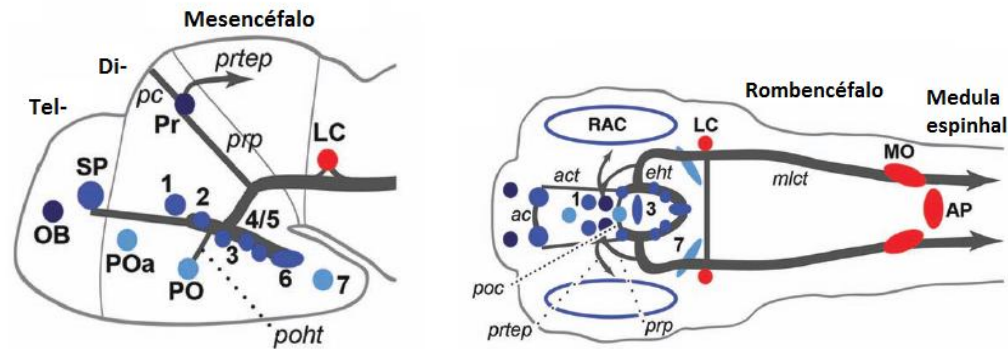


Figura 4: Grupos catecolaminérgicos em uma larva com 4dpf. Desenho esquemático dos grupos de neurônios dopaminérgicos (azul), noradrenérgicos (vermelho) e tratos reativos a TH (cinza). Grupos dopaminérgicos telencefálicos: SP: subpallium; OB: bulbo olfatório. Grupos dopaminérgicos diencéfalos: DC1-7; PO: região pré-óptica; POa: região pré-óptica anterior; Pr: pré tectum dorsal; RAC: células amácrinas retiniais. Grupos noradrenérgicos: LC: locus coeruleus; MO: medula oblonga; AP: área postrema. Tratos axonais catecolaminérgicos: eht: trato endohipotalâmico; mlct: trato catecolaminérgico medial longitudinal; pc: comissura posterior; poc: comissura pós-óptica; poht: trato pré-óptico hipotalâmico; prp: projeções pré tectais; prtep: projeções pretectumtectais. Adaptado de Schweitzer et al, 2011.

1.2.2. Vias dopaminérgicas em zebrafish

As projeções dos grupos dopaminérgicos já descritos em Zebrafish foram mais recentemente descritas em 2011 por Tay e colaboradores (FIG. 5), em larvas com 4dpf. Neste estudo, foi demonstrado que, nesta idade, somente os grupos DC2 e DC4 são fonte de projeções ascendentes para o subpallium, além de projetar-se para outras áreas do sistema nervoso central (SNC). Grupo DC5 projeta para o hipotálamo, tectum, rombencéfalo e medula espinhal, enquanto o DC6 projeta- para o hipotálamo e rombencéfalo. Os grupos DC3 e DC7 projetam-se localmente dentro do hipotálamo assim como o grupo do pré-óptico, só que este também se projeta localmente. Os neurônios do pré-tectum se projetam localmente e para o tectum, onde se arborizam extensivamente. O grupo DC1 possui projeções locais e para o hipotálamo. O subpallium se arboriza muito dentro de sua região além de mandar algumas projeções para tálamo e hipotálamo. Apesar dessas informações consideráveis, ainda são necessários

em teleósteos (MOK; MUNRO, 1998).

1.2.3. Sinalização dopaminérgica em zebrafish

Ao contrário dos mamíferos, os teleósteos possuem dois genes associados à expressão da tirosina hidroxilase: *th1* e *th2* (CANDY; COLLET, 2005). No cérebro de larvas com 12hpf os dois já são funcionais, mas a quantidade e locais onde são expressos são diferentes. Em larvas, o *th1* é expresso em maiores quantidades que o *th2* a partir do 1dpf até o 5dpf em regiões do telencéfalo, bulbo olfatório, diencéfalo, locus coeruleus e lobo caudado. Já o *th2* é expresso restritamente nas regiões pré-óptica e hipotalâmica em larvas com 8dpf (CHEN, Y. C.; PRIYADARSHINI; PANULA, 2009).

Grupos de vertebrados não mamíferos, possuem um maior número de receptores dopaminérgicos, o que dificulta a comparação entre os mesmos. Nos osteíctes ancestrais, existem quatro genes parálogos da família D1 que geram os subtipos de receptores D_{1A}, D_{1B(X)}, D_{1C} e D_{1E}, sendo que além desses o Zebrafish possui sete genes, sendo dois para cada subtipo. Na família D2, existem três genes receptores para D2 (D_{2a}, D_{2l} e D_{2b}) e três para D4 (D_{4a}, D_{4-rs} e D_{4b}). Apesar da existência desses genes adicionais, a fisiologia desses receptores é aparentemente conservada em relação aos mamíferos, apresentando leves diferenças estruturais e farmacológicas que não alteram a base fundamental de sua fisiologia (YAMAMOTO *et al.*, 2015).

Para a compreensão das vias intracelulares, várias abordagens foram realizadas para realizar uma comparação significativa entre mamíferos e o zebrafish. Em um destes estudos, foi feita uma única injeção intramuscular de 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) e 6-hydroxydopamina (6-OHDA) em peixes adultos, e foi observado a redução dos níveis de dopamina e significantes alterações comportamentais (ANICHTCHIK *et al.*, 2004). Em estudos com diversos outros teleósteos, análises moleculares e farmacológicas sugerem que estes só têm um tipo da enzima L-Monoamine oxidases (MAO), responsável por catalisar a oxidação de monoaminas, que possui função similar às duas isoformas existentes em mamíferos (ADEYEMO *et al.*, 1993; CHEN, K. *et al.*, 1994; KUMAZAWA *et al.*, 1998; NICOTRA; SENATORI, 1989; OBATA *et al.*, 1990). Além disso, também foi detectada a expressão de *dat* a partir de 18hpf

(HOLZSCHUH, 2001), e que um tratamento com MPTP entre 24hpf e 48hpf induziu uma redução da expressão de *dat*, mas um tratamento com selegilina (inibidor farmacológico de MAO-B), preveniu essa redução (LAM; KORZH; STRAHLE, 2005). Dessa forma, é possível realizar uma comparação entre os sistemas dopaminérgicos intracelulares entre mamíferos e o zebrafish e notar uma conservação evolutiva.

Com a compreensão dos fatos já citados, também é de extrema relevância observar quais são as projeções comportamentais dessas alterações celulares e fisiológicas, a fim de estabelecer uma possível correlação com distúrbios psiquiátricos observados em humanos e fazer uma transposição científica mais coesa. Com essa mentalidade, já foram realizados diversos estudos envolvendo alterações dopaminérgicas em teleósteos ramificando-se para comportamentos diversos como a agressão (FILBY *et al.*, 2010), vício (BRETAUD *et al.*, 2007; DARLAND; DOWLING, 2001) e comportamento motor (SOUZA; ROMANO-SILVA; TROPEPE, 2011; THIRUMALAI; CLINE, 2008). A partir desses, podemos fazer inferências a sistemas mais complexos e compreender a evolução do sistema dopaminérgico e suas projeções.

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Recentemente, nosso grupo utilizou o zebrafish como modelo experimental e demonstrou que receptores dopaminérgicos D2 modulam a sinalização de Akt em um cérebro em desenvolvimento. Além disso, foi observado que o tratamento crônico com dopamina entre os dias 3-5 dpf reduz o número de neurônios GABAérgicos em regiões específicas do cérebro da larva, como pallium e subpallium. Além das alterações morfológicas, o tratamento crônico reduziu o comportamento motor das larvas. Porém, é necessário investigar se as alterações comportamentais motoras causadas pelo aumento da sinalização dopaminérgica nesta janela desenvolvimental é sustentada ao longo do desenvolvimento.

As doenças mentais representam um crescente impacto econômico e estima-se que até 2030 o custo mundial com elas pode chegar a até \$6.0 trilhões, sendo que em 2010 já foi gasto cerca de \$2.5 trilhões (BLOOM *et al.*, 2011). Dentre os transtornos existentes, vários possuem relação com alterações dopaminérgicas as quais podem ser ocorrer em momentos críticos da vida ou estabelecidas durante o neurodesenvolvimento. O presente trabalho foi planejado com enfoque nessas últimas, como a esquizofrenia e o TDAH, devido aos seus fortes impactos econômicos e sociais. Essas doenças são responsáveis a diversas alterações bioquímicas, como o aumento da sinalização de D2 em pacientes com esquizofrenia (INSEL, 2010), e uma maior atividade de DAT nos neurônios dopaminérgicos em pacientes com TDAH (MADRAS; MILLER; FISCHMAN, 2005; SHARMA; COUTURE, 2014). Compreender os pontos críticos do papel da dopamina no desenvolvimento e quais alterações nestas janelas desenvolvimentais podem gerar, são de extrema importância para a compreensão de transtornos neuropsiquiátricos, e assim criar meios para auxiliar na prevenção, diagnóstico e tratamento.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a resposta comportamental motora da larva do zebrafish, é sustentada em diferentes idades, quando esta é submetida a um aumento da dopamina na janela desenvolvimental do 3-5dpf. Também buscou-se saber qual é a reação comportamental observada quando desafia-se essas larvas cronicamente tratadas com agonistas de D1 e D2 e se há uma relação entre os tempos de fosforilação da DARPP-32 e Akt com os comportamentos observados.

3.2. Objetivos específicos

- Analisar a resposta comportamental do tratamento crônico com dopamina durante o 3º ao 5º dia;
- Analisar a resposta comportamental de larvas desafiadas com agonistas de D1 e D2 após o tratamento crônico;
- Avaliar se as respostas comportamentais observadas possuem relação com os tempos de fosforilação das proteínas DARPP-32 e Akt;
- Analisar a resposta comportamental de todos parâmetros anteriormente citados nas idades de 5, 7 e 14dpf a fim de avaliar se há ou não sustentação das respostas obtidas ao longo do tempo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cuidados Gerais com zebrafish

O biotério onde é realizada a criação e manutenção do zebrafish, pertence ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Medicina Molecular (INCTMM) e 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 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 C, DAHM, 2002). 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° 304/2014.

4.1.1 Manutenção do Sistema zebrafish

Os peixes foram mantidos em um sistema de recirculação de automática de água, modelo Zebrafish Stand-Alone ZF0601 (Pentair) onde a água recircula 24 horas/dia e é tratada por vários meios que buscam manter a qualidade ideal de desenvolvimento para os peixes. Dentre estes meios pode-se citar a passagem da água por filtros de partículas grandes e pequenas, biológico com bactérias nitrificadoras, pelo carvão ativado e a aeração da água por uma bomba para saturação da mesma por oxigênio, o que é necessário para esses peixes. Nesse sistema, diariamente 10% da água circulante é descartada manualmente afim de evitar o acúmulo de compostos tóxicos. A água descartada é substituída por uma água limpa que foi previamente filtrada e aerada em barriletes, sendo essa filtração necessária para remoção de cloro ativo (tóxico para os peixes) e outros componentes tóxicos. O pH do sistema deve ser mantido entre 7.2-7.4 (avaliado por Phmetro portátil Lago, modelo PH-009 (I)) e deve ser corrigido (com bicarbonato de sódio ou ácido clorídrico) antes de entrar no sistema, buscando sempre a faixa estável do mesmo. A condutividade é mantida a aproximadamente 300 μ S e é corrigida com cloreto de cálcio (avaliada por condutímetro de mão – Combo pH & EC Hanna modelo HI 98129).

A sala é mantida em temperatura de 26-27°C e a água entre 27-28,5°C. O ciclo de luz nesta é controlado automaticamente por um interruptor horário (Coel – modelo RTST-20) e fornece 14 horas de luz e 10 horas de escuro, buscando simular uma iluminação típica de uma região tropical durante a primavera/verão. Esta possui luminosidade aproximada de 500 lux. Todos esses parâmetros são controlados diariamente e buscam reduzir o estresse nos peixes, além de manter um ambiente estável para reprodução durante todo o ano.

*4.1.2 Origem das Matrizes de *Danio rerio**

As matrizes selvagens desses peixes são originárias de uma piscicultura na zona rural do município de Muriaé/MG. Desse local foram adquiridos, em 2010, cerca de 400 peixes, sendo 200 fêmeas e 200 machos. Os peixes foram introduzidos no sistema descrito e onde foram colocados para reprodução a fim de manter o estoque das matrizes e a produção de ovos para experimentos.

4.1.3 Reprodução

Após uma hora da última alimentação dos peixes, que ocorre no final do período vespertino, são selecionados uma fêmea e dois machos para a reprodução. Esses são transferidos, com uma rede de coleta, para um tanque de reprodução (volume de um litro), o qual possui um fundo falso com fendas por onde os ovos fertilizados (embriões) passam e depositam-se no fundo. O fundo falso serve como um meio de proteção dos ovos contra a predação dos próprios adultos. Os peixes permanecem nesse aquário até a manhã seguinte, afim de aumentar a probabilidade de obtenção de ovos. Na coleta, os peixes adultos são removidos e retornados aos seus aquários de origem e a água do aquário de reprodução é vertida em um coador de plástico de poros finos. Quando estão retidos nesse coador, os ovos são lavados com jatos de água provenientes de uma pisseta que contém água do sistema, a fim de remover fezes aderidas ao córion dos embriões. Os ovos são em seguida transferidos para uma placa de Petri (100mm – 24mL), na densidade máxima de 80 embriões por placa, a qual contém meio de embrião E2 (15mM NaCl, 0.5mM KCl, 0.49mM MgSO₄.7H₂O, 0.15mM KH₂PO₄, 0.042mM Na₂PO₄, 0.1mM CaCl₂ e 0.07mM NaHCO₃, pH 7.2). Esse meio é necessário para reduzir o crescimento bacteriano, fornecer os minerais

necessários para o desenvolvimento dos embriões e para manter o meio tamponado.

4.1.4 Crescimento dos Embriões

A placa de Petri é mantida em uma incubadora (estufa mini-incubadora QUIMIS - Modelo Q315M13) a 28°C, com o mesmo ciclo claro –escuro de 14:10h a qual os adultos são submetidos, sendo esse controlado por um interruptor horário. Cada placa de Petri é colocada sobre um papel cartão de cor verde, buscando evitar a sensação de ausência de fundo gerada pelo suporte gradeado da incubadora. O meio E2 é diariamente trocado corrigindo sempre o pH para 7,2 caso seja necessário, e embriões não viáveis, restos de córions eclodidos e quaisquer outros detritos são removidos. Larvas de até 7dpf não precisam de alimento pois se nutrem de vitelo endógeno do saco vitelínico. Nos experimentos realizados, os embriões utilizados vieram de fêmeas diferentes buscando obter uma amostra mais heterogênea.

4.1.5 Alimentação

Como larvas até o 7dpf não precisam de alimentação, pois se alimentam de seu vitelo endógeno, somente as larvas a partir do 7dpf receberam ração (Sera Micron). Essa é própria para larvas recém-eclodidas e era administrada duas vezes ao dia, uma no período matutino e a outra no período vespertino. A ração começou a ser administrada ao fim do 7dpf e foi dada até o 14dpf no período da manhã.

4.1.6 Eutanásia dos Animais

O protocolo seguido é de acordo com a recomendação da literatura (Wilson et al., 2009). As larvas foram transferidas para recipiente com água do sistema que foi resfriada, por gelo triturado, a uma temperatura de 2 a 4°C. Essas larvas permaneceram nessa água por no mínimo de 10 minutos e, quando mortos, foram descartados apropriadamente.

4.2. Fármacos Utilizados

Os fármacos utilizados nos experimentos envolvendo o zebrafish estão descritos da Tabela 1, junto com informações sobre a empresa, seu código, veículo e concentração utilizada nos tratamentos. As soluções de dopamina eram sempre preparadas frescas e as soluções de quinpirole e SKF-38393 foram preparadas e estocadas em alíquotas no freezer a -20°C. Os fármacos foram administrados por diluição no meio E2 onde as larvas se encontravam. As concentrações para tratamento foram determinadas a partir do trabalho de Souza et al., 2011.

Tabela 1: Fármacos utilizados nos experimentos com larvas de zebrafish.

Fármaco	Empresa	Código	Veículo	Concentração do tratamento
Dopamina	Sigma-Aldrich	H8502-10G	Água	100µM
Quinpirole	Sigma-Aldrich	Q102-10MG	Água	10µM
SKF-38393	Sigma-Aldrich	D047-100MG	Água	10µM

4.3. Tratamentos Farmacológicos

4.3.1 Tratamento crônico

As larvas saíram do córion naturalmente e no 3dpf e foram transferidas para placas de 24 poços (Sarstedt). Essas larvas foram cronicamente tratadas com dopamina por 48h, e para isso foram divididas em dois grupos, cada um com doze poços de 1mL: um grupo continha somente meio E2 (CC) e outro continha meio E2 e dopamina (CD) numa concentração final de 100uM. No 4dpf o processo era refeito a fim de repor os poços de dopamina com um tratamento fresco e garantir a efetividade do mesmo. No 5dpf, as larvas foram lavadas três vezes com meio E2 e deixadas com a última lavagem por duas horas para garantir a eliminação de toda dopamina. Todas concentrações e procedimentos foram retirados do trabalho anterior do grupo (Souza, *et al.*, 2011).

4.3.2 Desafios farmacológicos

As larvas eram transferidas para arenas translúcidas individuais com 200µL de volume cada, mantendo as concentrações citadas na Tabela 1. Para cada experimento, uma droga diferente era usada no desafio, após o tratamento crônico com dopamina. Os desafios foram realizados no momento da gravação dos vídeos e possuía duração de 30 minutos, sendo esse procedimento mantido para três diferentes idades (5, 7 e 14dpf).

4.3.3 Divisão dos Grupos

Os dois grupos criados a partir do tratamento crônico, o grupo controle (CC) e o grupo com tratamento crônico (DC), foram subdivididos a partir da introdução do desafio. Para a realização desse, 6 larvas de cada um deles, sofreu o desafio no momento das filmagens e a elas foram dados outros nomes: CD (grupo CC desafiado com dopamina) e DD (grupo DC desafiado com dopamina), CQ (grupo CC desafiado com quinpirole) e DQ (grupo DC desafiado com quinpirole) e CS (grupo CC desafiado com SKF-38393) e DS (grupo DC desafiado com SKF-38393). Uma síntese desses grupos é apresentada na Tabela 2. Assim, em cada experimento existem quatro grupos: CC, CD e os dois grupos desafios com o nome dependente da droga usada.

Tabela 2: Nomes dos grupos e qual tratamento foram submetidos.

Nome	Tratamento
CC	Nenhum
CD	Desafiado com dopamina
CS	Desafiado com SKF-38393
CQ	Desafiado com quinpirole
DC	Tratamento crônico com dopamina
DD	Tratamento crônico com dopamina e desafio com dopamina
DS	Tratamento crônico com dopamina e desafio com SKF-38393
DQ	Tratamento crônico com dopamina e desafio com quinpirole

4.4. Testes Comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados com as larvas de Zebrafish em idades de 5dpf, 7dpf e 14dpf (FIG. 6). Em todas idades, as larvas eram colocadas em arenas individuais, com 200 μ L, as quais eram colocadas em superfícies retroiluminadas e filmadas de cima por uma webcam (Microsoft – Q2F-00013 LifeCam Studio 1080p). Isso gerou vídeos, com duração de 30 minutos, que foram analisados pelo software ANY-maze (versão 4.99m) para quatro parâmetros diferentes: distância percorrida, velocidade média, tempo móvel e episódios de movimento. Foram escolhidas essas características uma vez que cada fornece uma informação mais detalhada do comportamento motor. A distância percorrida indica a capacidade de deslocamento total, a velocidade média quantos metros a larva andou por segundo, o tempo móvel indica o deslocamento de pixels da larva durante a filmagem o que não necessariamente indica deslocamento enquanto os episódios de movimento são diretamente associados a deslocamento, uma vez que só são contabilizados quando há um deslocamento da larva com a cabeça. Esses parâmetros foram analisados em dois tempos do vídeo: nos 5 minutos iniciais e nos 30 minutos totais. Esses tempos foram escolhidos com base no tempo de fosforilação conhecido tanto para a DARPP-32 (Yger & Girault, 2011) quanto para a Akt (Beaulieu et al., 2005).

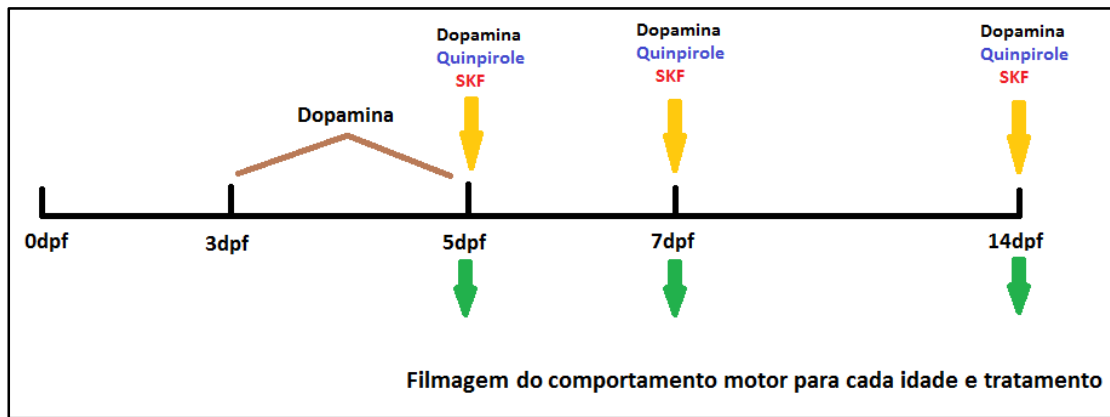


Figura 6: Desenho experimental.

4.5. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo programa SigmaPlot 11.0. Para os testes de atividade locomotora foi utilizado o teste Two Way ANOVA. Para a consequente identificação de diferença entre os grupos, foi utilizado o teste de Tukey, utilizando a significância em $p < 0,05$. Todas as figuras mostram os gráficos com as barras demonstrando a média \pm SEM (erro padrão das médias). As figuras demonstram as comparações significantes por meio do símbolo (* $p < 0,05$). O número amostral de cada grupo está indicado nas barras referentes a cada grupo. Além disso, foram realizadas razões com três diferentes variáveis: distância percorrida, episódios de movimento e tempo móvel. As razões foram as seguintes: dividiu-se a distância pelo tempo móvel e o resultado foi multiplicado por 1000, dividiu-se a distância pelos episódios de movimento e o resultado foi multiplicado por 1000 e por fim dividiu-se o tempo móvel pelos episódios de movimento e o resultado foi multiplicado por 100.

5. RESULTADOS

Pesquisas anteriores do nosso laboratório demonstraram que o tratamento crônico com dopamina, entre os dias 3 e 5 pós-fertilização, reduz o número de neurônios GABAérgicos no telencéfalo e o número de movimentos iniciados das larvas de zebrafish com 5dpf (Souza et al. 2011). Como no trabalho anterior só foi avaliado o número de movimento, neste estudo nós verificamos se o tratamento crônico com dopamina durante o 3º ao 5º dpf foi capaz de alterar diversos parâmetros do comportamento motor em larvas de zebrafish com 5dpf, como distância percorrida, velocidade média, tempo móvel e episódios de movimentos. Numa segunda etapa, verificamos se as alterações locomotoras observadas aos 5dpf permaneciam até as idades 7dpf e 14dpf. E, para finalizar, investigamos se a resposta comportamental motora em relação à sinalização dopaminérgica estaria alterada nestes animais. Portanto, foram realizados desafios farmacológicos com três drogas diferentes: dopamina, SKF-38393 (agonista de D1) e quinpirole (agonista de D2/D3). Durante os desafios farmacológicos, analisamos o comportamento motor das larvas durante dois diferentes períodos de tempo, primeiros 5 minutos, associados à sinalização por DARPP-32, e nos primeiros 30 minutos, correlacionados à sinalização por Akt.

5.1. 5.1. Efeito dos tratamentos sobre a distância percorrida de larvas com 5, 7 e 14dpf

Ao avaliarmos a distância percorrida por larvas de 5dpf tratadas exclusivamente com dopamina, não é possível observar nenhuma diferença entre os grupos analisados com 5 e 30 minutos (FIG. 7A e 7B). No tratamento com SKF-38393 observa-se que esse tratamento reduz significativamente o comportamento motor da larva com 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 38,134$ $p < 0,001$) entre os grupos CC e CS (Tukey, $p < 0,001$), DC e DS (Tukey, $p < 0,001$) e CC e DC (Tukey, $p < 0,001$). Na análise de 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 16,153$ $p < 0,001$), ainda com o desafio com SKF-38393, há uma redução significativa de comportamento entre CC e CS (Tukey, $p < 0,001$), CC e DC (Tukey, $p < 0,001$) e entre CS e DS (Tukey, $p = 0,024$). Na análise de 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,281} = 25,103$ $p < 0,001$) do tratamento

com quinpirole, esse gerou uma redução comportamental entre CC e CQ (Tukey, $p < 0,001$), DC e DQ (Tukey, $p = 0,001$) e CC e DC (Tukey, $p < 0,001$). No comportamento avaliado com 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,281} = 6,455$ $p = 0,012$) o tratamento foi reduziu significativamente o comportamento entre os grupos CC e CQ (Tukey, $p < 0,001$), DC e DD (Tukey, $p = 0,042$), CC e DC (Tukey, $p < 0,001$) e entre os grupos CQ e DQ (Tukey, $p = 0,016$).

No tratamento com larvas de 7dpf, o tratamento exclusivo com dopamina gerou reduções comportamentais significativas na análise de 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,566} = 3,609$ $p = 0,058$) entre os grupos CC e CD (Tukey, $p < 0,001$), DC e DD (Tukey, $p = 0,002$) e entre CC e DC (Tukey, $p = 0,008$). No mesmo tratamento, mas na análise de 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,566} = 1,253$ $p = 0,263$) o grupo CD é significativamente reduzido em relação ao grupo CC (Tukey, $p < 0,001$), assim como os grupos DC e DD (Tukey, $p = 0,001$) e CC e DC (Tukey, $p = 0,002$). Com o tratamento de SKF-38393 na análise de 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 0,323$ $p = 0,570$) os grupos CC e CS (Tukey, $p < 0,001$), DC e DS (Tukey, $p < 0,001$) e CC e DC (Tukey, $p = 0,014$) apresentam uma redução significativa entre si. Na análise de 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 0,627$ $p = 0,429$) os mesmos grupos da análise anterior, permanecem exibindo uma redução comportamental, sendo eles CC e CS (Tukey, $p < 0,001$), DC e DS (Tukey, $p = 0,003$) e CC e DC (Tukey, $p = 0,007$). Por fim, com o tratamento com quinpirole observa-se que com 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 3,361$ $p = 0,068$) os grupos CC e CQ possuem uma redução comportamental significativa (Tukey, $p < 0,001$) assim como o grupo DC e DQ (Tukey, $p < 0,001$). Na análise com 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 6,461$ $p = 0,012$) permanecem as mesmas reduções entre CC e CQ (Tukey, $p < 0,001$) e DC e DQ (Tukey, $p < 0,001$).

Por fim, na análise com 14dpf observa-se que com 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,187} = 0,722$ $p = 0,397$) há uma redução significativa entre CC e CD (Tukey, $p < 0,001$) e entre DC e DD (Tukey, $p < 0,001$). Com 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,187} = 4,074$ $p = 0,045$), observa-se o mesmo padrão de redução comportamental entre CC e CD (Tukey, $p = 0,003$) e DC e DD (Tukey, $p < 0,001$). No tratamento com SKF-38393 na análise de 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,188} = 1,596$ $p = 0,208$) observa-se uma redução

significativa entre CC e CS (Tukey, $p < 0,001$) e DC e DS (Tukey, $p < 0,001$). Com 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,188} = 0,0412$ $p = 0,839$) há reduções significativas entre os grupos CC e CS (Tukey, $p < 0,001$), DC e DS (Tukey, $p < 0,001$) e CS e DS (Tukey, $p = 0,035$). No tratamento final com quinpirole a análise com 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,188} = 0,122$ $p = 0,727$) os grupos CC e CQ (Tukey, $p < 0,001$) e DC e DQ (Tukey, $p = 0,003$) apresentam redução comportamental significativa. Na análise de 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,188} = 1,213$ $p = 0,272$) permanece o mesmo padrão de redução entre CC e CQ (Tukey, $p < 0,001$) e DC e DQ (Tukey, $p = 0,002$).

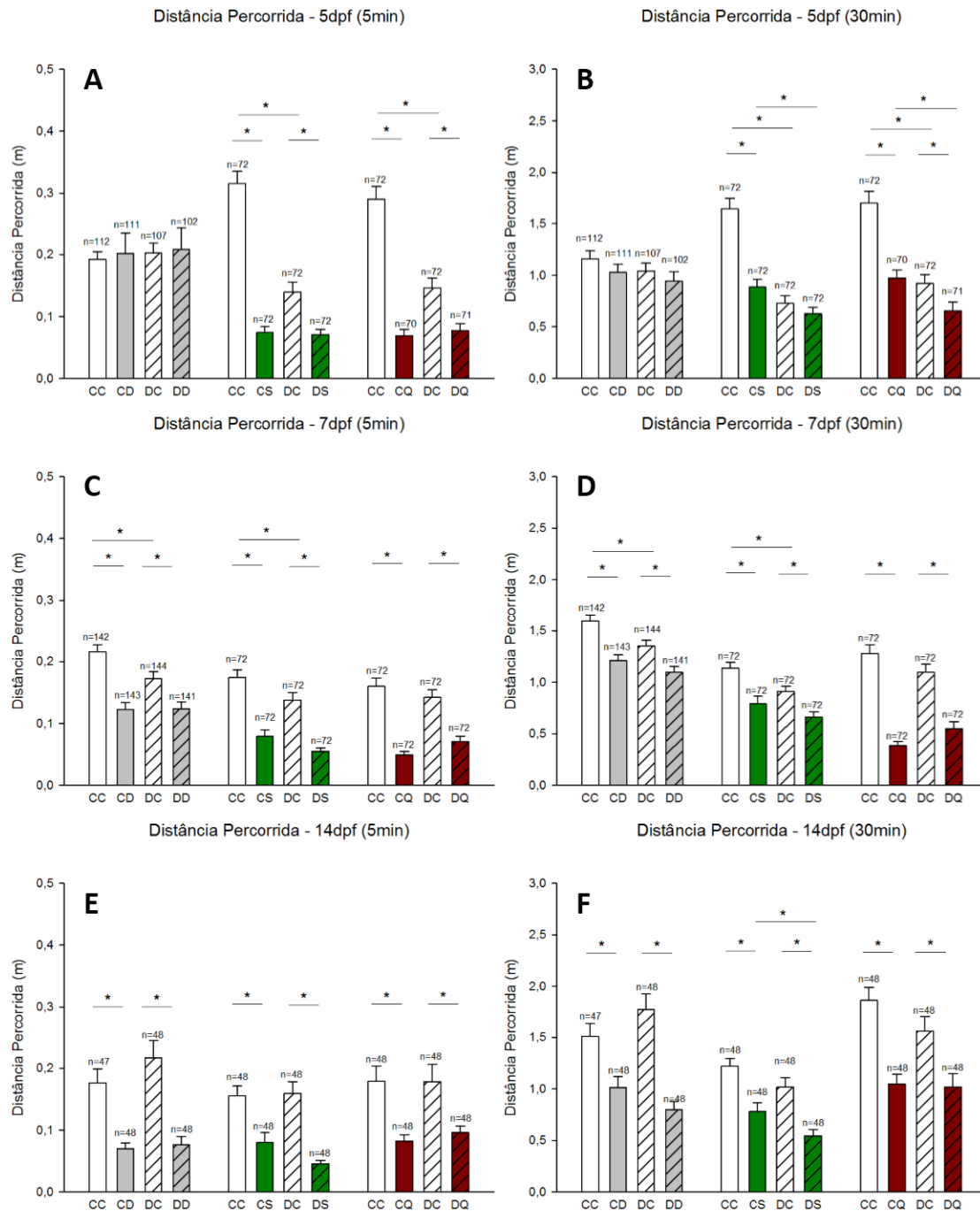


Figura 7: Distância percorrida (m) por larvas com 5, 7 e 14dpf, durante os primeiros 5 e 30 minutos de desafio com dopamina, SKF-38393 ou quinpirole. Controle (CC); desafiado com dopamina (CD); tratado cronicamente com dopamina (DC); tratado cronicamente com dopamina e desafiado com dopamina (DD); desafiado com SKF-38393 (CS); tratado cronicamente com dopamina e desafiado com SKF-38393 (DS); desafiado com quinpirole (CQ); tratado cronicamente com dopamina e desafiado com quinpirole (DQ). Média \pm SEM; Two Way ANOVA, pós-hoc Tukey; * $p < 0.05$.

5.2. Efeito dos tratamentos sobre a velocidade média de larvas com 5, 7 e 14dpf

A segunda variável comportamental avaliada foi a velocidade média, que indica a quantidade de metros percorridos por segundo. Nessa análise, não foi possível observar nenhuma diferença significativa nas larvas de 5dpf tratadas exclusivamente com dopamina tanto em 5 como em 30 minutos. No tratamento SKF-38393 com 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 29,073$ $p < 0,001$) há reduções significativas entre os grupos CC e CS (Tukey, $p < 0,001$), DC e DS (Tukey, $p = 0,002$) e CC e DC (Tukey, $p < 0,001$). Na análise comportamental de 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 9,087$ $p = 0,003$) também é possível observar reduções significativas entre CC e CS (Tukey, $p < 0,001$), CC e DC (Tukey, $p < 0,001$) e CS e DS (Tukey, $p = 0,002$). No tratamento com quinpirole na análise de 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 17,228$ $p < 0,001$) os grupos CC e CQ possuem uma redução significativa (Tukey, $p < 0,001$), assim como DC e DQ (Tukey, $p = 0,002$) e CC e DC (Tukey, $p < 0,001$). Também observamos que na análise de 30 minutos do tratamento com quinpirole (Two Way ANOVA interactions $F_{4,281} = 1,907$ $p = 0,168$) há reduções significativas entre os grupos CC e CQ (Tukey, $p < 0,001$), CC e DC (Tukey, $p < 0,001$) e entre CQ e DQ (Tukey, $p = 0,021$).

Com 7dpf observa-se, já no tratamento exclusivo com dopamina, uma diferença na análise de 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,566} = 1,821$ $p = 0,178$) sendo essa redução observada somente nos grupos CC e CD (Tukey, $p < 0,001$) e DC e DD (Tukey, $p < 0,001$). Observando o mesmo tratamento, mas com o tempo de 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,566} = 0,101$ $p = 0,751$) a diferença persiste em CC e CD (Tukey, $p < 0,001$) e DC e DD (Tukey, $p < 0,001$) e uma diferença adicional surge entre CC e DC (Tukey, $p = 0,022$). Passando para o tratamento com SKF-38393 na análise de 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 1,385$ $p = 0,240$) nota-se diferenças significativas entre CC e CS (Tukey, $p < 0,001$), DC e DS (Tukey, $p < 0,001$) e CC e DC (Tukey, $p = 0,004$). Com 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 0,229$ $p = 0,632$) persistem as mesmas diferenças entre CC e CS (Tukey, $p = 0,001$), DC e DS (Tukey, $p = 0,011$) e CC e DC (Tukey, $p = 0,018$). No tratamento com quinpirole,

observando a análise de 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 2,439$ $p = 0,119$) somente os grupos CC e CQ (Tukey, $p < 0,001$) e DC e DQ (Tukey, $p < 0,001$) apresentam diferenças significativas. Na análise de 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,188} = 1,071$ $p = 0,302$) a diferença persiste nos mesmos grupos CC e CQ (Tukey, $p < 0,001$) e DC e DQ (Tukey, $p = 0,006$).

Na última idade analisada, 14 dpf, o tratamento exclusivo com dopamina nos primeiros 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,187} = 2,336$ $p = 0,128$) de análise comportamental gerou diferenças entre os grupos CC e CD (Tukey, $p = 0,001$), DC e DD (Tukey, $p < 0,001$) e CC e DC (Tukey, $p = 0,011$). Na análise com 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,187} = 2,330$ $p = 0,129$), observa-se redução significativa somente nos grupos CC e CD (Tukey, $p < 0,001$) e DC e DD (Tukey, $p < 0,001$). No tratamento com SKF-38393 a análise de 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,188} = 1,851$ $p = 0,175$) mostra redução significativa entre os grupos CC e CS (Tukey, $p = 0,005$) e DC e DS (Tukey, $p < 0,001$). Com 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,188} = 0,000$ $p = 1,000$) observamos diferenças somente nos mesmos grupos CC e CS (Tukey, $p = 0,002$) e DC e DD (Tukey, $p = 0,002$). No último tratamento, observamos que com 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,188} = 0,979$ $p = 0,324$) há diferença entre CC e CQ (Tukey, $p < 0,001$) e entre DC e DQ (Tukey, $p = 0,009$). Por fim, na análise de 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,188} = 1,071$ $p = 0,302$) os mesmos grupos citados anteriormente exibem reduções significativas sendo eles CC e CQ (Tukey, $p < 0,001$) e DC e DQ (Tukey, $p = 0,006$).

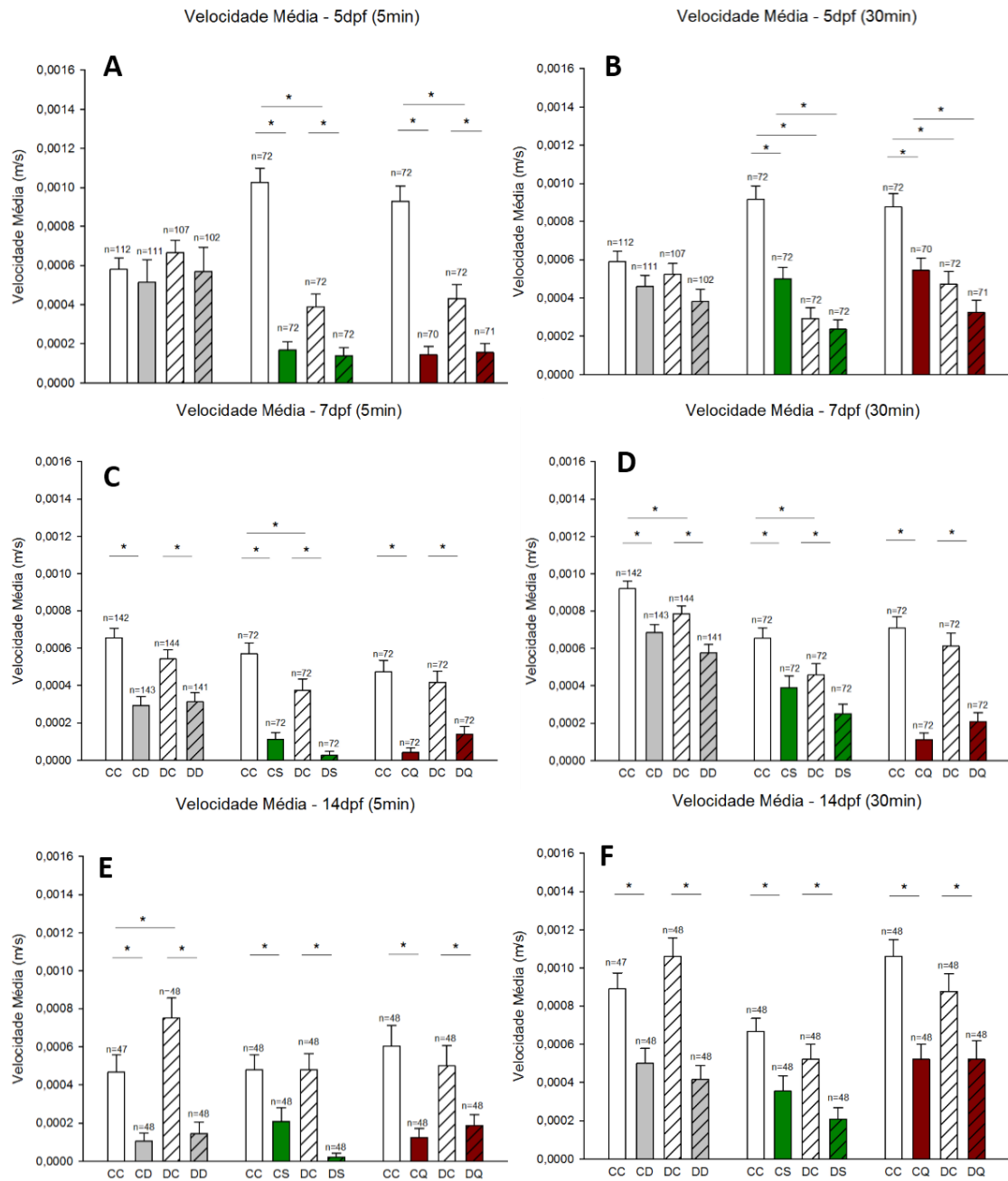


Figura 8: Velocidade média (m/s) por larvas com 5, 7 e 14 dpf nos primeiros 5 e 30 minutos de desafio com dopamina, SKF-38393 ou quinpirole. Controle (CC); desafiado com dopamina (CD); tratado cronicamente com dopamina (DC); tratado cronicamente com dopamina e desafiado com dopamina (DD); desafiado com SKF-38393 (CS); tratado cronicamente com dopamina e desafiado com SKF-38393 (DS); desafiado com quinpirole (CQ); tratado cronicamente com dopamina e desafiado com quinpirole (DQ). Média \pm SEM; Two Way ANOVA, pós-hoc Tukey; * $p < 0.05$.

5.3. Efeito dos tratamentos sobre o tempo móvel de larvas com 5, 7 e 14dpf

A seguinte análise refere-se ao tempo móvel que é detectado pelo software pelo deslocamento de pixels identificados entre frames. Essa diferença entre pixels pode ou não identificar movimento, uma vez que o deslocamento da larva no mesmo lugar, também altera a quantidade de pixels entre os frames.

No tratamento com dopamina com 5dpf e em 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,428} = 0,457$ $p = 0,499$) há diferença significativa entre CC e CD (Tukey, $p = 0,007$) e entre DC e DD (Tukey, $p < 0,001$). Já com 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,428} = 0,0580$ $p = 0,810$) as mesmas diferenças significativas entre CC e CD (Tukey, $p = 0,003$) e DC e DD (Tukey, $p = 0,012$) aparecem. No tratamento com SKF-38393 durante os 5 primeiros minutos da análise comportamental (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 10,574$ $p = 0,001$) observa-se diferença entre CC e CS (Tukey, $p < 0,001$) e CC e DC (Tukey, $p < 0,001$). Já na análise de 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 9,252$ $p = 0,003$) os grupos CC e CS (Tukey, $p = 0,001$) e CC e DC (Tukey, $p < 0,001$) são os únicos que apresentam diferenças significativas. Já no tratamento com quinpirole nos primeiros 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,281} = 7,832$ $p = 0,005$) a diferença existe entre os grupos CC e CQ (Tukey, $p < 0,001$) e CC e DC (Tukey, $p = 0,013$). Por outro lado, na análise de 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,281} = 6,588$ $p = 0,011$) continuamos observando as mesmas diferenças entre os grupos CC e CQ (Tukey, $p < 0,001$) e CC e DC (Tukey, $p = 0,006$).

Nas larvas com 7dpf, observa-se que no tratamento exclusivo com dopamina nos 5 primeiros minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,566} = 0,276$ $p = 0,599$) todas as análises realizadas demonstraram diferenças significativas sendo elas CC e CD (Tukey, $p < 0,001$), DC e DD (Tukey, $p = 0,002$), CC e DC (Tukey, $p < 0,001$) e CD e DD (Tukey, $p < 0,001$). Na análise de 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,566} = 0,559$ $p = 0,455$) todos os mesmos grupos continuam exibindo reduções significativas sendo eles CC e CD (Tukey, $p < 0,001$), DC e DD (Tukey, $p < 0,001$), CC e DC (Tukey, $p < 0,001$) e CD e DD (Tukey, $p = 0,002$). Já no tratamento com SKF-38393 nos primeiros 5 minutos (Two Way ANOVA

interactions $F_{4,284} = 0,0775$ $p = 0,781$) a diferença existe entre os grupos CC e CS (Tukey, $p = 0,003$), DC e DS (Tukey, $p = 0,009$) e CC e DC (Tukey, $p = 0,025$). Entretanto, quando observa-se a análise com 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 0,541$ $p = 0,463$) além das diferenças entre CC e CS (Tukey, $p < 0,001$), DC e DS (Tukey, $p = 0,012$) e CC e DC (Tukey, $p = 0,002$) há uma diferença adicional entre CS e DS (Tukey, $p = 0,034$). Por fim, nos 5 minutos iniciais do tratamento com quinpirole não observamos diferenças significativas entre os grupos. Porém, na análise de 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 1,639$ $p = 0,202$) é possível observar diferenças entre os grupos CC e CQ (Tukey, $p < 0,001$), DC e DQ (Tukey, $p < 0,001$) e CC e DC (Tukey, $p = 0,034$).

Nas larvas com idade de 14dpf, nos primeiros 5 minutos do tratamento exclusivo com dopamina (Two Way ANOVA interactions $F_{4,187} = 0,416$ $p = 0,520$) somente os grupos DC e DD (Tukey, $p = 0,020$) exibem diferença significativa. Na análise de 30 minutos desse mesmo tratamento (Two Way ANOVA interactions $F_{4,187} = 1,613$ $p = 0,206$) além da persistente diferença entre DC e DD (Tukey, $p < 0,001$) uma diferença entre CC e CD (Tukey, $p = 0,032$) também é detectada. No tratamento com SKF-38393 nos primeiros 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,188} = 2,012$ $p = 0,158$) observa-se uma redução significativa entre DC e DS (Tukey, $p = 0,002$) e outra entre CS e DS (Tukey, $p = 0,036$). Com a mesma droga, mas observando seu efeito por 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,188} = 0,287$ $p = 0,593$) há redução comportamental entre os grupos CC e CS (Tukey, $p = 0,007$), DC e DS (Tukey, $p < 0,001$) e CS e DS (Tukey, $p = 0,008$). No último tratamento, realizado com quinpirole, nos primeiros 5 minutos não é possível observar uma diferença significativa entre os grupos analisados. Entretanto, na análise de 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,188} = 0,716$ $p = 0,399$) surge uma diferença entre os grupos CC e CQ (Tukey, $p < 0,001$) e DC e DD (Tukey, $p < 0,001$).

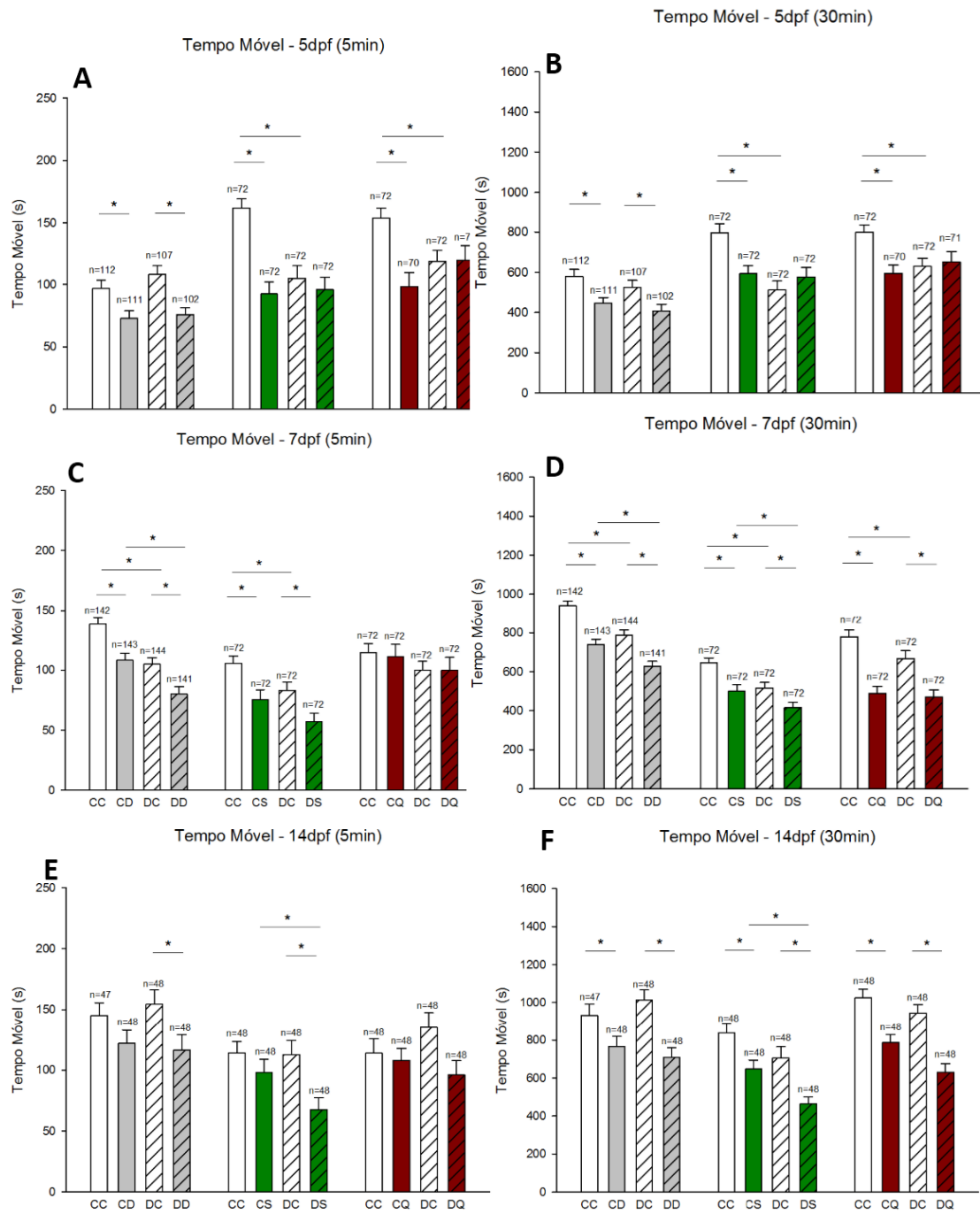


Figura 9: Tempo móvel (s) por larvas com 5, 7 e 14dpf nos primeiros 5 e 30 minutos de desafio com dopamina, SKF-38393 ou quinpirole. Controle (CC); desafiado com dopamina (CD); tratado cronicamente com dopamina (DC); tratado cronicamente com dopamina e desafiado com dopamina (DD); desafiado com SKF-38393 (CS); tratado cronicamente com dopamina e desafiado com SKF-38393 (DS); desafiado com quinpirole (CQ); tratado cronicamente com dopamina e desafiado com quinpirole (DQ). Média \pm SEM; Two Way ANOVA, pós-hoc Tukey; * $p < 0.05$.

5.4. Efeito dos tratamentos sobre os episódios de movimento de larvas com 5, 7 e 14dpf

A última análise em relação com comportamento locomotor das larvas utilizadas, refere-se aos episódios de movimento por elas realizados. Esses episódios são caracterizados pela propulsão das larvas para frente com a cabeça para realizar um deslocamento.

Na idade de 5dpf, o tratamento com dopamina exhibe diferença nos primeiros 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,428} = 1,288$ $p = 0,257$) entre os grupos CC e CD (Tukey, $p < 0,001$). Entretanto na análise de 30 minutos, não há diferença em nenhum dos grupos. No tratamento com SKF-38393 na primeira análise referente aos primeiros 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 14,743$ $p < 0,001$) observa-se uma redução comportamental entre os grupos CC e CS (Tukey, $p < 0,001$), DC e DS (Tukey, $p < 0,001$) e CC e DC (Tukey, $p < 0,001$). Na análise de 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 6,147$ $p = 0,014$) os mesmos grupos apresentam diferenças significativas sendo eles CC e CS (Tukey, $p < 0,001$), DC e DS (Tukey, $p = 0,014$) e CC e DC (Tukey, $p < 0,001$) e além deles o grupo CS e DS também apresenta diferença significativa (Tukey, $p = 0,032$). Já no tratamento com o agonista quinpirole, com 5 minutos observa-se diferença (Two Way ANOVA interactions $F_{4,281} = 5,350$ $p = 0,021$) entre CC e CQ (Tukey, $p < 0,001$), DC e DQ (Tukey, $p < 0,001$) além dos grupos CC e DC (Tukey, $p < 0,001$). Com 30 minutos a diferença (Two Way ANOVA interactions $F_{4,281} = 2,427$ $p = 0,120$) todos os grupos exibem diferenças significativas sendo elas entre CC e CQ (Tukey, $p < 0,001$), DC e DQ (Tukey, $p < 0,001$), CC e DC (Tukey, $p < 0,001$) e CS e DS (Tukey, $p = 0,017$).

Com a idade de 7dpf é possível observar diferenças no comportamento analisado nos primeiros 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,566} = 0,405$ $p = 0,525$) entre os grupos CC e CD (Tukey, $p < 0,001$) e DC e DD (Tukey, $p < 0,001$). Na análise dos 30 minutos totais a diferença (Two Way ANOVA interactions $F_{4,566} = 0,511$ $p = 0,475$) reside entre os mesmos grupos CC e CD (Tukey, $p < 0,001$) e DC e DD (Tukey, $p < 0,001$). No tratamento com SKF-38393 é possível observar uma diferença (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 2,001$

$p = 0,158$) nos primeiros 5 minutos entre os grupos CC e CS (Tukey, $p < 0,001$), DC e DS (Tukey, $p < 0,001$) e CC e DC (Tukey, $p = 0,007$). Observamos que nos 30 minutos totais, a diferença entre os grupos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 3,423$ $p = 0,065$) permanece entre os grupos da primeira análise sendo eles CC e CS (Tukey, $p < 0,001$), DC e DS (Tukey, $p < 0,001$) e CC e DC (Tukey, $p = 0,018$). Na última droga utilizada, o quinpirole, observa-se uma diferença significativa (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 0,0127$ $p = 0,910$) entre os grupos CC e CQ (Tukey, $p < 0,001$) e DC e DQ (Tukey, $p < 0,001$). Interessantemente o mesmo resultado é observado na análise referente aos 30 minutos totais (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 0,999$ $p = 0,318$) entre os grupos CC e CQ (Tukey, $p < 0,001$) e DC e DQ (Tukey, $p < 0,001$).

Por fim, na idade de 14dpf o tratamento exclusivo com dopamina já exibe diferenças significativas logo nos primeiros 5 minutos de análise comportamental (Two Way ANOVA interactions $F_{4,187} = 0,0900$ $p = 0,764$) entre os grupos CC e CD (Tukey, $p < 0,001$) e DC e DD (Tukey, $p < 0,001$). Nos 30 minutos totais a diferença (Two Way ANOVA interactions $F_{4,187} = 0,0786$ $p = 0,780$) continua sendo entre os mesmos grupos CC e CD (Tukey, $p < 0,001$) e DC e DD (Tukey, $p = 0,002$). No tratamento com SKF-38393 nos primeiros 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,188} = 0,418$ $p = 0,518$) observamos uma diferença entre CC e DS (Tukey, $p < 0,001$) e DC e DS (Tukey, $p < 0,001$). Já com 30 minutos a análise indica uma diferença (Two Way ANOVA interactions $F_{4,188} = 1,401$ $p = 0,238$) entre os mesmos grupos CC e CS (Tukey, $p < 0,001$) e DC e DS (Tukey, $p = 0,013$) além de uma diferença adicional entre os grupos CC e DC (Tukey, $p = 0,029$). Por fim, o tratamento com quinpirole exibiu uma diferença nos primeiros 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,188} = 0,702$ $p = 0,400$) entre os grupos CC e CQ (Tukey, $p = 0,001$) e DC e DQ (Tukey, $p < 0,001$). Com 30 minutos de análise, a diferença (Two Way ANOVA interactions $F_{4,188} = 0,139$ $p = 0,710$) persiste nos mesmos grupos CC e DQ (Tukey, $p < 0,001$) e DC e DQ (Tukey, $p < 0,001$).

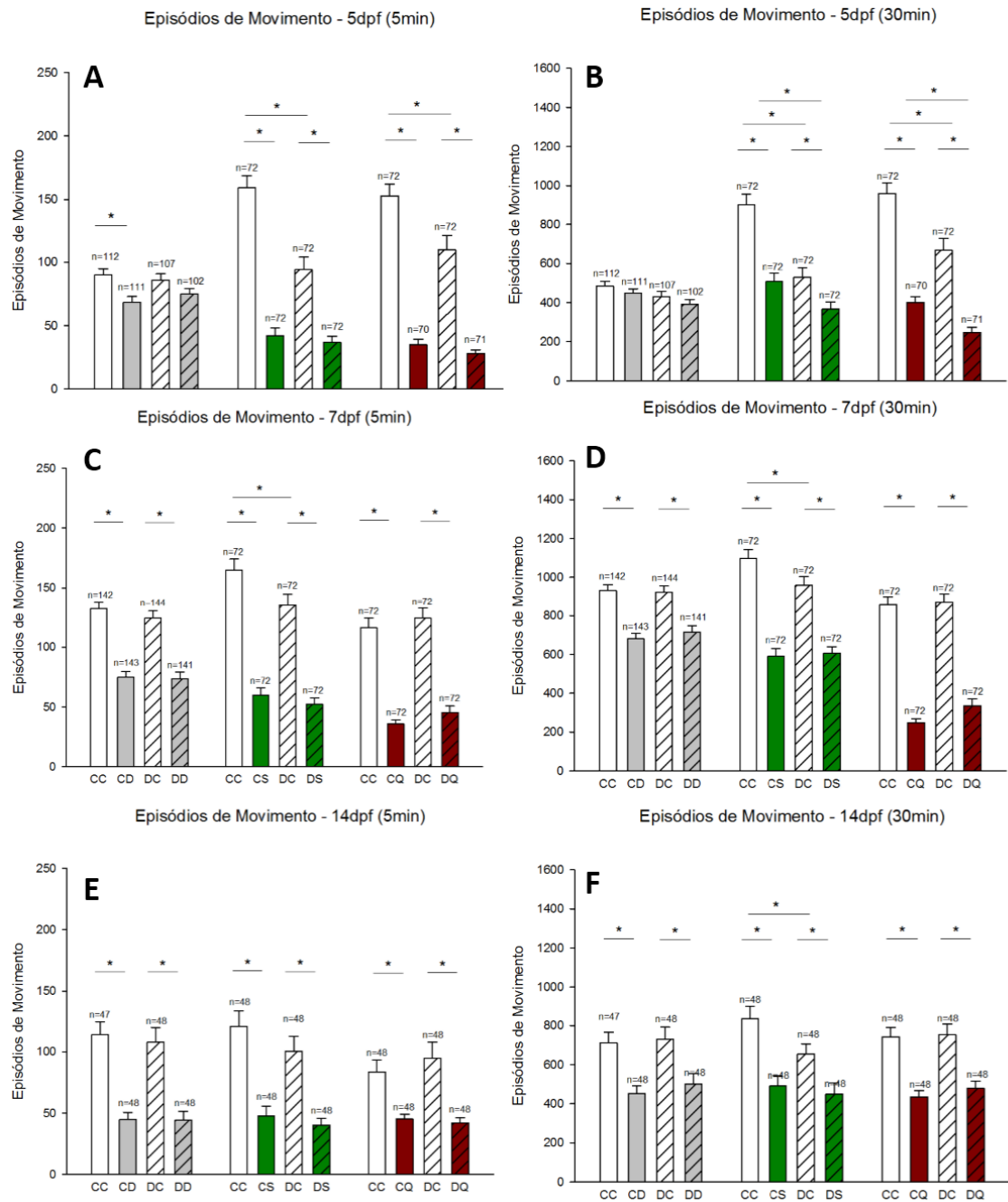


Figura 10: Episódios de movimento por larvas com 5, 7 e 14dpf nos primeiros 5 e 30 minutos de desafio com dopamina, SKF-38393 ou quinpirole. Controle (CC); desafiado com dopamina (CD); tratado cronicamente com dopamina (DC); tratado cronicamente com dopamina e desafiado com dopamina (DD); desafiado com SKF-38393 (CS); tratado cronicamente com dopamina e desafiado com SKF-38393 (DS); desafiado com quinpirole (CQ); tratado cronicamente com dopamina e desafiado com quinpirole (DQ). Média \pm SEM; Two Way ANOVA, pós-hoc Tukey; * $p < 0.05$.

5.5. Relação entre tempo em movimento por episódios de movimento nas larvas com 5, 7 e 14dpf

A primeira razão estabelecida entre os dados brutos, foi entre tempo móvel e episódios de movimento. Com ela, pretendíamos compreender no tempo móvel total que a larva se movimentava, quanto dele era voltado para um comportamento locomotor para o deslocamento e não outros tipos de movimento, como ela nadando em volta de si mesma, se mantendo equilibrada ou outros tipos de movimentos. Dessa forma, quanto menor a barra, maior o tempo utilizado para o deslocamento, sugerindo um não comprometimento do sistema locomotor.

Nas larvas com 5dpf, não é possível observar nenhuma diferença significativa entre os grupos em nenhum dos dois tempos de análise. Já com SKF-38393 observa-se uma diferença somente com a análise de 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,279} = 0,299$ $p = 0,585$) entre CC e CS (Tukey, $p = 0,024$), não existindo nenhuma com 30 minutos. Na análise relativa ao tratamento com quinpirole nos primeiros 5 minutos há diferença (Two Way ANOVA interactions $F_{4,278} = 0,0657$ $p = 0,798$) entre CC e CQ (Tukey, $p = 0,004$) e DC e DQ (Tukey, $p = 0,011$). Com essa mesma droga, nos 30 minutos de análise (Two Way ANOVA interactions $F_{4,281} = 4,390$ $p = 0,037$) a diferença é entre os grupos DC e DQ (Tukey, $p < 0,001$) e CQ e DQ (Tukey, $p < 0,001$).

Em larvas de 7dpf, no tratamento exclusivo com dopamina só há diferença na análise de 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,565} = 0,0792$ $p = 0,779$) entre os grupos CC e CD (Tukey, $p = 0,010$) e DC e DD (Tukey, $p = 0,030$). No tratamento com SKF-38393 nos primeiros 5 minutos a diferença (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 2,109$ $p = 0,147$) reside entre os grupos CC e CS (Tukey, $p = 0,002$). Já na análise com os 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 0,531$ $p = 0,467$) a diferença é entre os grupos CC e CS (Tukey, $p = 0,022$). Por fim, no tratamento com quinpirole na análise de 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,281} = 0,0202$ $p = 0,887$) mostra diferença entre os grupos CC e CQ (Tukey, $p < 0,001$) e DC e DQ (Tukey, $p < 0,001$). Esses mesmos grupos mantêm a diferença na análise de 30 minutos (Two Way ANOVA

interactions $F_{4,284} = 0,174$ $p = 0,676$) com CC e CQ (Tukey, $p < 0,001$) e DC e DQ (Tukey, $p < 0,001$).

Por fim, com larvas com 14dpf o tratamento com dopamina, não gera nenhuma diferença significativa em nenhum dos dois tempos de análise. Já no tratamento com SKF-38393 em 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,187} = 0,147$ $p = 0,702$) há diferença entre CC e CS (Tukey, $p = 0,045$). Entretanto com 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,188} = 0,370$ $p = 0,544$) a diferença é entre DC e DS (Tukey, $p = 0,044$). Finalmente, o tratamento com quinpirole só gera diferença nas análises de 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,188} = 3,127$ $p = 0,079$) entre os grupos CC e CQ (Tukey, $p = 0,005$).

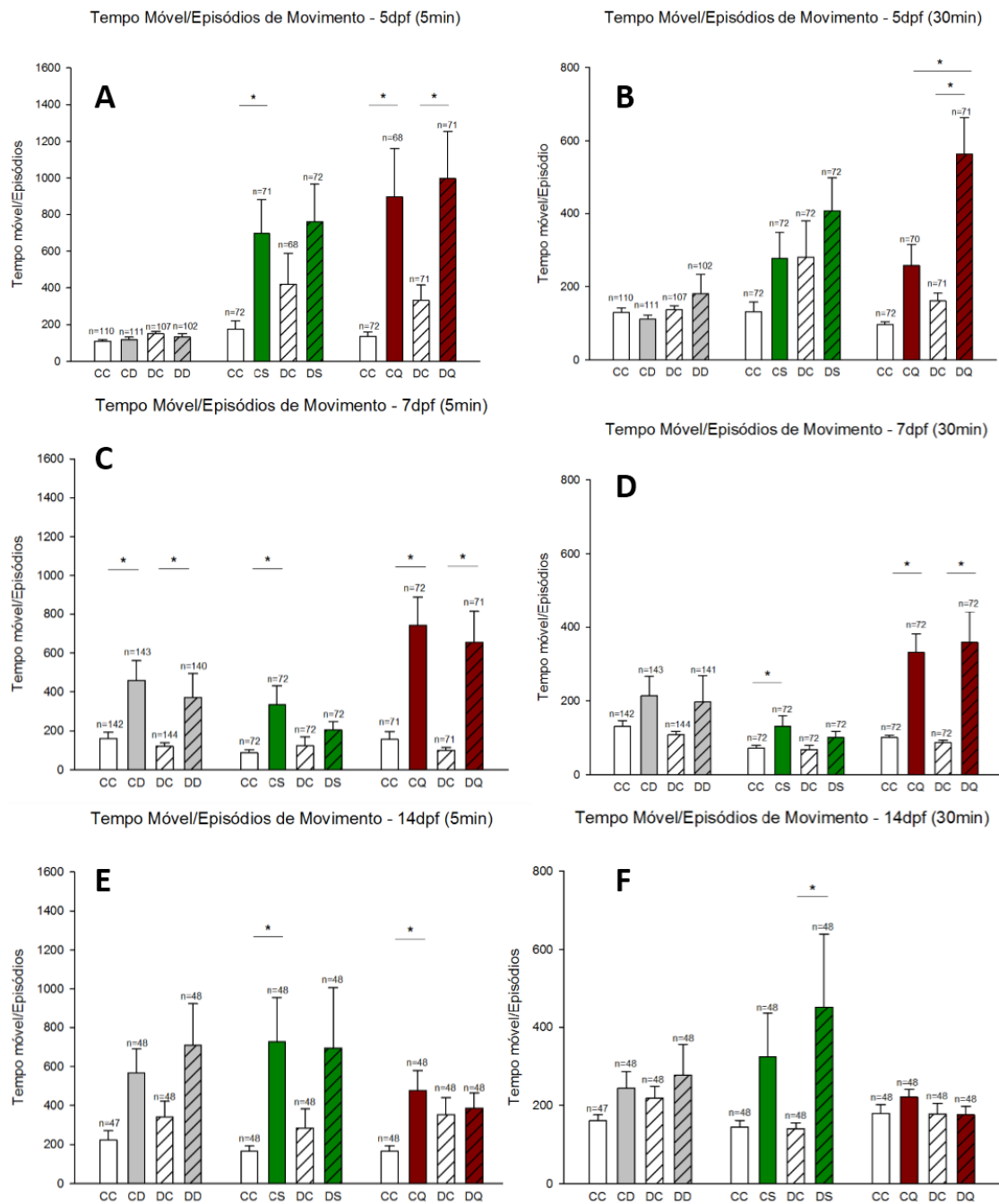


Figura 11: Relação entre tempo móvel e episódios de movimento em larvas com 5, 7 e 14dpf nos primeiros 5 e 30 minutos de desafio com dopamina, SKF-38393 ou quinpirole. Controle (CC); desafiado com dopamina (CD); tratado cronicamente com dopamina (DC); tratado cronicamente com dopamina e desafiado com dopamina (DD); desafiado com SKF-38393 (CS); tratado cronicamente com dopamina e desafiado com SKF-38393 (DS); desafiado com quinpirole (CQ); tratado cronicamente com dopamina e desafiado com quinpirole (DQ). Média \pm SEM; Two Way ANOVA, pós-hoc Tukey; * $p < 0.05$.

5.6. Relação entre distância percorrida e número de episódios de movimento nas larvas com 5, 7 e 14dpf

Nessa razão, buscamos compreender quanto a larva se deslocava em cada episódios de movimento. Uma barra menor, indica que ela cobria uma menor metragem por episódio de propulsão e vice versa.

Em larvas de 5dpf, as larvas tratadas exclusivamente com dopamina não exibiram diferenças significativas em nenhum dos dois tempos de análise. Interessantemente, no tratamento com SKF-38393 é possível observar uma diferença somente na análise de 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,279} = 1,918$ $p=0,167$) entre DC e DS (Tukey, $p=0,007$). No tratamento com quinpirole a análise de 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,278} = 2,856$ $p=0,092$) os grupos DC e DQ são significativamente diferentes (Tukey, $p < 0,001$). No comportamento referente aos 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,281} = 4,130$ $p=0,043$) observamos diferenças entre CC e CQ (Tukey, $p=0,012$) e DC e DQ (Tukey, $p < 0,001$).

Com 7dpf, novamente não observamos nenhuma diferença entre os grupos tratados exclusivamente com a dopamina. Com o agonista SKF-38393 na análise de 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 0,370$ $p=0,544$) os grupos CC e CS (Tukey, $p=0,021$) são significativamente diferentes. Com 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 1,683$ $p=0,196$) além da persistente diferença entre CC e CS (Tukey, $p < 0,001$) surge uma diferença entre CS e DS (Tukey, $p < 0,001$). No tratamento final com quinpirole, os primeiros 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,281} = 6,569$ $p=0,011$) resultam em um diferença entre DC e DQ (Tukey, $p < 0,001$) e outra em CQ e DQ (Tukey, $p=0,014$). Já com 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,284} = 5,658$ $p=0,018$) há uma diferença entre DC e DQ (Tukey, $p < 0,001$) e CC e DC (Tukey, $p=0,034$).

Finalmente na idade de 14dpf, poucas diferenças existem entre os grupos analisados. No tratamento com dopamina, nos primeiros 5 minutos a diferença (Two Way ANOVA interactions $F_{4,187} = 4,487$ $p=0,035$) a diferença é somente

entre os grupos CC e DC (Tukey, $p=0,023$). Já com 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,187} = 6,169$ $p =0,014$) permanece a diferença entre os mesmos grupos CC e DC (Tukey, $p<0,001$). O tratamento com SKF-38393 não gera diferença em nenhum dos tempos analisados. Entretanto no tratamento com o agonista quinpirole, observa-se que com 5 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,188} = 4,934$ $p =0,028$) os grupos CQ e DQ são significativamente diferentes (Tukey, $p =0,021$), enquanto na análise de 30 minutos (Two Way ANOVA interactions $F_{4,188} = 1,162$ $p =0,282$) a diferença é entre os grupo CC e DC (Tukey, $p =0,004$).

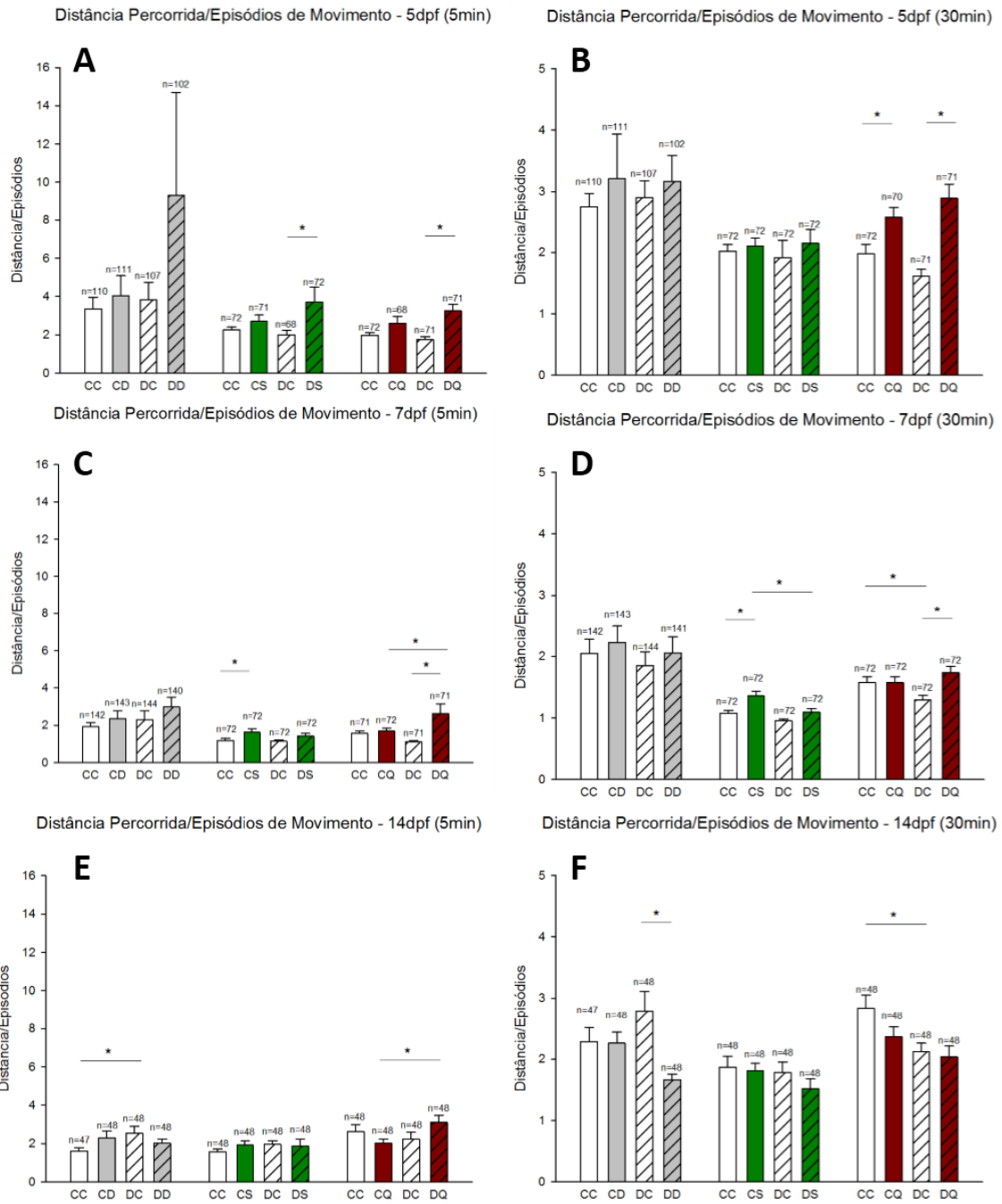


Figura 12: Relação entre distância percorrida e episódios de movimento em larvas com 5, 7 e 14dpf nos primeiros 5 e 30 minutos de desafio com dopamina, SKF-38393 ou quinpirole. Controle (CC); desafiado com dopamina (CD); tratado cronicamente com dopamina (DC); tratado cronicamente com dopamina e desafiado com dopamina (DD); desafiado com SKF-38393 (CS); tratado cronicamente com dopamina e desafiado com SKF-38393 (DS); desafiado com quinpirole (CQ); tratado cronicamente com dopamina e desafiado com quinpirole (DQ). Média \pm SEM; Two Way ANOVA, pós-hoc Tukey; * $p < 0.05$.

6. DISCUSSÃO

Ao avaliarmos o efeito do tratamento crônico com dopamina entre o 3º e 5º dpf no comportamento motor das larvas nas idades de 5, 7 e 14 dpf, foi possível observar consequências em diferentes parâmetros comportamentais. Inicialmente, observando a resposta comportamental na idade de 5dpf foi possível notar que, em todas variáveis, o tratamento exclusivo com dopamina não gerou muitas diferenças entre os grupos estudados. Uma vez que a dopamina usada para os desafios, funciona como um agonista não específico, foi possível teorizar que se por acaso houvesse algum efeito relacionado a um receptor específico, a ligação da dopamina com seu antagonista, poderia cancelar seu efeito. Assim, esse tratamento foi levado como uma base para a comparação com os agonistas específicos de D1 e D2. Apesar de não ser um resultado idêntico ao trabalho anterior de nosso grupo (Souza et al., 2011), acreditamos ser resultado de uma diferença na maneira de contabilizar os movimentos, sendo que no primeiro trabalho foi feito de maneira manual (contagem a olho nu) e no trabalho atual, foi realizado por um software dedicado a contabilização de comportamento.

Os desafios realizados nos grupos com os agonistas dopaminérgicos dopamina (CD), SKF-38393 (CS) e quinpirole (CQ), levaram à uma redução comportamental significativa do grupo desafiado em relação ao grupo controle. Isso indica que o que as larvas responderam comportamentalmente ao desafio com essas drogas nos tempos de 5 e 30 minutos. Quando comparamos o grupo cronicamente tratado com dopamina (DC) com os grupos também tratados cronicamente com dopamina e em seguida desafiados por dopamina (DD), SKF-38393 (DS) e quinpirole (DQ), foi possível observar que o desafio no grupo crônico reduziu o comportamento motor em todas análises.

Essa redução comportamental sugere que mesmo com o sistema abalado pelo tratamento crônico com dopamina, este foi capaz de exibir uma resposta motora quando novamente desafiado, podendo ser comparado ao grupo controle desafiado. Mesmo com a redução comportamental observada entre DC e CC, o sistema foi capaz de criar uma resposta quando desafiado com as três drogas

diferentes, indicando que houve uma adaptação da resposta para que, mesmo em uma amplitude menor, fosse capaz de reagir quando estimulado. Além disso, é possível observar que nas análises de 30 minutos, há uma diferença significativa entre os grupos desafiados CD e DD, CS e DS e CQ e DQ. Nas análises de 5 minutos, esse tipo de diferença só aparece na análise de tempo móvel no tratamento do dopamina no 7dpf e com SKF-38393 no 14dpf. Isso sugere que a via da Akt é mais sensível ao estresse crônico dopaminérgico do que a via da DARPP-32.

Com 7dpf, a diferença existente entre CC e DC em todas as análises com 5dpf, é presente em todas as análises. Isso sugere que os efeitos do estresse dopaminérgico persistem nesta idade.

É possível observar que a resposta comportamental ao desafio com quinpirole e com SKF-38393 é maior que quando o desafio é feito com dopamina. Quando desafiarmos o sistema tratado cronicamente com SKF-38393, quinpirole e dopamina, foi possível observar que o sistema continua sensível a alterações dopaminérgicas. Esta observação foi reforçada quando comparamos o comportamento observado com o grupo controle desafiado. Alguns dos parâmetros analisados sugerem que os grupos DD, DS e DQ apresentam uma maior resposta dopaminérgica em relação aos grupos CD, CS e CQ, respectivamente, apesar de não serem significativamente diferentes. Em algumas análises de 30 minutos, novamente observamos uma diferença significativa entre os grupos DD, DS e DQ e os grupos CD, CS e CQ, fortalecendo a hipótese de que a via da Akt é mais afetada pelo estresse dopaminérgico em relação a via da DARPP-32 em comportamentos motores.

Com 14 dpf, a diferença existente entre os grupos DC e CC antes observado deixa de existir. Isso sugere que o sistema foi capaz de recuperar sua fisiologia motora em todas os parâmetros analisados. Além disso quando desafiarmos esse sistema, teoricamente recuperado no âmbito motor, com dopamina, SKF-38393 e quinpirole, observamos níveis de resposta comportamental similar aos grupos controle desafiados CD, CS e CQ, sugerindo que o sistema dopaminérgico se recuperou.

Dentre os dados brutos, observamos que não houve diferença na resposta entre o desafio com SKF-38393 e quinpirole, mesmo sendo proposto que eles se ligam a receptores dopaminérgicos D1 e D2/D3, respectivamente. Sugerimos 3 hipóteses para a resposta comportamental motora similar para ambos os agonistas. (1) os agonistas utilizados não são específicos para os receptores tipo-D1 e tipo-D2 no zebrafish; (2) os receptores tipo-D1 e tipo-D2 do zebrafish não são acoplados à proteína G_s e proteína G_i , como sugerido por Yamamoto (2005); (3) os neurônios que expressam os receptores D1 e D2 no cérebro larval são diferentes, atuando em circuitos paralelos que levam à emergência do mesmo fenômeno comportamental. Para compreender isso, novos experimentos serão necessários.

A partir desses dados brutos, fizemos a correlação de três variáveis (distância, tempo móvel e episódios de movimento) a fim de compreender melhor como elas se relacionavam para produzir o comportamento das larvas. Primeiro observamos a relação entre tempo móvel por episódios de movimento, onde é possível identificar quanto do tempo que a larva está movendo é realmente dedicado para o deslocamento. Então nessa análise, foi possível tirar a informação de que em larvas com 5dpf tratadas com os agonistas específicos SKF-38393 e quinpirole passam menos tempo se movendo sem a propulsão para deslocamento, sugerindo que elas tem mais motilidade do que mobilidade tanto durante os primeiros 5 quanto durante os 30 minutos da análise. Esse padrão se estende por todas as idades analisadas.

Em seguida temos a associação dos dados da distância percorrida pelos episódios de movimento. Nessa análise buscamos relacionar quanto, em um episódio de movimento, a larva é capaz de nadar, dando foco na sua mobilidade para assim compreender se seu sistema motor ainda é funcional ou foi alterado por algum dos tratamentos realizados. Com essa análise, pode-se observar que a maioria das larvas possui um comportamento equivalente ao controle, sugerindo que mesmo com o estresse dopaminérgico crônico e os desafios com os agonistas, o sistema foi capaz de se adaptar para gerar uma resposta equivalente as observadas pelos grupos controle. Em alguns tratamento com

agonistas específicos, foi possível observar que as larvas deslocam-se mais por episódio de movimento. Isso pode sugerir que o sistema motor delas não foi comprometido e as diferenças que observamos em dados anteriores, podem ser devido a alterações em sistemas neurais superiores que podem alterar a motivação, impulsividade ou ansiedade das larvas.

Os resultados que obtivemos nesse trabalho, levantaram inúmeras dúvidas em relação ao sistema dopaminérgico no zebrafish. Classicamente, sabe-se que a ativação de receptores D1 aumenta a atividade motora e de D2 reduz a atividade motora. Porém, alguns trabalhos relatam que ambos os agonistas dopaminérgicos, como o SKF-38393 e o quinpirole, podem aumentar o comportamento motor em zebrafish assim como em mamíferos (Irons et al., 2013). Entretanto, em comparação a esse trabalho, podemos levantar várias diferenças em relação ao protocolo, concentração da droga, idade das larvas, diferença entre uma resposta imediata e observada após um período de tempo e filmagem em ambiente claro que nos impossibilitam consolidar algum tipo de resposta. A redução comportamental aqui observada pode ser devido a diversos fatores como a diferentes janelas desenvolvimentais analisadas, a diferenças individuais, que o quinpirole agiu mais rápido que o SKF-38393 (Irons et al., 2013), que o circuito existente em larvas dessas idades é diferente (podendo existir circuitos paralelos distintos para D1 e D2), que a variedade de receptores existente nos peixes reage de forma diferente aos dos mamíferos nessas idades e condições aqui testadas ou até mesmo que os receptores de D1 e D2 podem estar associados a diferentes proteínas G, o que geraria uma resposta diferente. Para confirmar isso seria necessária uma medição mais específica de atividade das drogas e das células e receptores alvo com técnicas como o c-fos e potencial de ligação de D1 e D2, além de testes comportamentais que avaliassem a ansiedade e motivação para selecionar qual circuito pode ser envolvido com as alterações aqui observadas.

Além disso nas adaptações observadas entre o grupo DC e CC, pode ter ocorrido um remanejamento de receptores na membrana ou a alteração de células do sistema, como a redução de células GABAérgicas (Souza et al., 2011). Para confirmar isso são necessários testes adicionais como a marcação por

anticorpos específicos aos receptores da membrana e células alvo para compreender como eles reagiriam nessas condições e assim compreender melhor a resposta dopaminérgica aqui observada.

Nosso trabalho foi de extrema relevância uma vez que demonstramos que o sistema dopaminérgico, mesmo submetido a períodos de estresse em janelas desenvolvimentais críticas, é capaz de recuperar seu sistema locomotor a níveis do grupo controle. Essa informação é de extrema valia para medicina translacional e estudos de doenças desenvolvimentais, uma vez que mostra que o sistema dopaminérgico em vertebrados é capaz de uma grande adaptação, especialmente no sistema locomotor, como aqui demonstrado. Dentre as análises realizadas, é possível observar nos tratamentos de 30 minutos, uma menor sensibilidade dos grupos DD/DS/DQ em relação a DC. Isso nos leva a sugerir que é possível que a proteína Akt esteja mais relacionada com as alterações motoras do que a DARPP-32, nas análises de 5 minutos. Esse resultado é de acordo com os resultados anteriores de nosso grupo (Souza et al., 2011), onde as alterações com a Akt possuíram uma relação com a alteração motora das larvas de zebrafish.

7. CONCLUSÃO

Esse trabalho permitiu compreender melhor o comportamento de um sistema cronicamente alterado pelo tratamento com dopamina e sua persistência ao longo do desenvolvimento. Os desafios com agonistas dopaminérgicos mostraram que é possível que a sinalização desse sistema por partes de seus receptores possa ser alterada nas idades e condições aqui testadas, o que faria sentido considerando a grande variação de receptores presentes em zebrafish.

O maior objetivo desse trabalho foi realizar um *screening* de parâmetros comportamentais motores em diferentes idades e com diferentes desafios dopaminérgicos, para melhor compreender a consequência do estresse dopaminérgico durante o desenvolvimento e sua persistência. Os resultados observados levantaram mais questionamentos dos que inicialmente propostos, o que é algo positivo e relevante para a ciência, uma vez que abre a porta para novas descobertas, compreensão da ciência básica e modelos experimentais, além de questionamentos e possíveis melhorias aplicadas a melhor compreensão e tratamentos de transtornos em humanos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEYEMO, O. M. *et al.* L-deprenyl confers specific protection against MPTP-induced Parkinson's disease-like movement disorder in the goldfish. *European Journal of Pharmacology*, v. 240, n. 2–3, p. 185–193, 1993.

ANDLIN-SOBOCKI, P.; REHM, J. Cost of addiction in Europe. *European Journal of Neurology*, v. 12, n. SUPPL. 1, p. 28–33, 2005.

ANICHTCHIK, O. V *et al.* Neurochemical and behavioural changes in zebrafish *Danio rerio* after systemic administration of 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Journal of neurochemistry*, v. 88, n. 2, p. 443–453, 2004.

BATEUP, H. S. *et al.* Cell type-specific regulation of DARPP-32 phosphorylation by psychostimulant and antipsychotic drugs. *Nature neuroscience*, v. 11, n. 8, p. 932–939, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18622401>.

BEAULIEU, J. M. *et al.* An Akt/??-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell*, v. 122, n. 2, p. 261–273, 2005.

BEAULIEU, J.-M. *et al.* Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 14, p. 5099–104, 2004. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/content/long/101/14/5099>>.

BEAULIEU, J.-M. *et al.* Regulation of Akt signaling by D2 and D3 dopamine receptors in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 27, n. 4, p. 881–885, 2007.

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

BENES, F. M. Emerging principles of altered neural circuitry in schizophrenia.

Brain Research Reviews, v. 31, n. 2–3, p. 251–269, 2000.

BENTIVOGLIO, M.; MORELLI, M. Chapter I The organization and circuits of mesencephalic dopaminergic neurons and the distribution of dopamine receptors in the brain. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, v. 21, p. 1–107, 2005.

BIBB, J. A *et al.* Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature*, v. 402, n. 6762, p. 669–671, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10604473>.

BJÖRKLUND, A.; DUNNETT, S. B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends in Neurosciences*, v. 30, n. 5, p. 194–202, 2007.

BLASCHKO, H. The activity of l(-)-dopa decarboxylase. *The Journal of physiology*, v. 101, n. 3, p. 337–49, 1942. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1393346&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.

BLOOM, D. E. *et al.* The Global Economic Burden of Noncommunicable Diseases. *World Economic Forum*, n. September, p. 1–46, 2011. Disponível em: <<http://ideas.repec.org/p/gdm/wpaper/8712.html>>.

BRETAUD, S. *et al.* A choice behavior for morphine reveals experience-dependent drug preference and underlying neural substrates in developing larval zebrafish. *Neuroscience*, v. 146, n. 3, p. 1109–1116, 2007.

CANDY, J.; COLLET, C. Two tyrosine hydroxylase genes in teleosts. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*, v. 1727, n. 1, p. 35–44, 2005.

CARLSSON, A. *et al.* On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science*, v. 127, n. 3296, p. 471, 1958. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=13529006>.

CHEN, K. *et al.* Cloning of a novel monoamine oxidase cDNA from trout liver. *Mol Pharmacol*, v. 46, n. 6, p. 1226–1233, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin->

post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0007808446>.

CHEN, Y. C.; PRIYADARSHINI, M.; PANULA, P. Complementary developmental expression of the two tyrosine hydroxylase transcripts in zebrafish. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 132, n. 4, p. 375–381, 2009.

CHONG, H. Y. *et al.* Global economic burden of schizophrenia: a systematic review. *Neuropsychiatric disease and treatment*, v. 12, p. 357–73, 2016. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4762470&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.

CRANDALL, J. E. *et al.* Dopamine receptor activation modulates GABA neuron migration from the basal forebrain to the cerebral cortex. *J Neurosci*, v. 27, n. 14, p. 3813–3822, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17409246>>.

DAHLSTROEM, A; FUXE, K. EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF MONOAMINE-CONTAINING NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. I. DEMONSTRATION OF MONOAMINES IN THE CELL BODIES OF BRAIN STEM NEURONS. *Acta physiologica Scandinavica*, p. 2015, 1964.

DARLAND, T.; DOWLING, J. E. Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 20, p. 11691–6, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11553778>>.

DE MEI, C. *et al.* Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. *Current Opinion in Pharmacology*. [S.l: s.n.], 2009

DIAZ, J. *et al.* Selective expression of dopamine D3 receptor mRNA in proliferative zones during embryonic development of the rat brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 17, n. 11, p. 4282–92, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9151745>>.

DOOLEY, K. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, v. 10, n. 3, p. 252–256, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959437X00000745>>.

DUNNETT, S. B. Motor function(s) of the nigrostriatal dopamine system: studies of lesions and behavior. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, v. 21, n. Chapter V, p. 237–301, 2005.

EMAMIAN, E. S. *et al.* Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia. *Nature genetics*, v. 36, n. 2, p. 131–137, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14745448>>.

FILBY, A. L. *et al.* Unravelling the neurophysiological basis of aggression in a fish model. *BMC genomics*, v. 11, p. 498, 2010.

FILIPPI, A. *et al.* Expression of the paralogous tyrosine hydroxylase encoding genes th1 and th2 reveals the full complement of dopaminergic and noradrenergic neurons in zebrafish larval and juvenile brain. *Journal of Comparative Neurology*, v. 518, n. 4, p. 423–438, 2010.

FOLGUEIRA, M. *et al.* Morphogenesis underlying the development of the everted teleost telencephalon. *Neural development*, v. 7, p. 32, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3520737&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.

FRIEDRICH, R. W.; JACOBSON, G. A.; ZHU, P. Circuit Neuroscience in Zebrafish. *Current Biology*, v. 20, n. 8, p. R371–R381, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2010.02.039>>.

GANZ, J. *et al.* Subdivisions of the adult zebrafish pallium based on molecular marker analysis. *F1000Research*, n. 3, p. 308, 2014.

GANZ, J. *et al.* Subdivisions of the adult zebrafish subpallium by molecular marker analysis. *Journal of Comparative Neurology*, v. 520, n. 3, p. 633–655, 2012.

GOULD, T. D.; MANJI, H. K. Glycogen synthase kinase-3: a putative molecular target for lithium mimetic drugs. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, v. 30, n. 7, p. 1223–1237, 2005.

HEMMINGS, H. C. *et al.* DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature*, v. 310, n.

5977, p. 503–505, 1984.

HÖKFELT, T., MARTENSSON, R., BJÖRKLUND, A. & GOLDSTEIN, M. in *Handbook of Chemical Neuroanatomy (Classical Transmitters in the CNS, Part I)* Vol. 2 eds A. Björklund & T.Hökfelt) 409-440 (Elsevier, 1984).

HOLTZ, P. Dopadecarboxylase. v. 27, n. April, p. 724–725, 1939.

HOLZSCHUH, J. Dopamine transporter expression distinguishes dopaminergic neurons from other catecholaminergic neurons in the developing zebrafish embryo. *Mechanisms of Development*, v. 101, n. 1–2, p. 237–243, 2001.

Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925477301002878>>.

HOWES, O. D.; KAPUR, S. *The dopamine hypothesis of schizophrenia: Version III - The final common pathway. Schizophrenia Bulletin*. [S.l: s.n.], 2009

HURD, Y. L.; HALL, H. Chapter IX Human forebrain dopamine systems: Characterization of the normal brain and in relation to psychiatric disorders. *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, v. 21, p. 525–571, 2005.

INSEL, T. R. Rethinking schizophrenia. *Nature*, v. 468, n. 7321, p. 187–193, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature09552>>.

IVERSEN, S. D.; IVERSEN, L. L. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends in Neurosciences*, v. 30, n. 5, p. 188–193, 2007.

JONES, S. R. *et al.* Mechanisms of Amphetamine Action Revealed in Mice Lacking the Dopamine Transporter. v. 18, n. 6, p. 1979–1986, 1998.

JR., M. R. B. Comparative aspects of forebrain organization in the ray-finned fishes: touchstones or not? *Brain, behavior and evolution*, v. 46, n. 6-8977–5, p. 259–274, 1995. Disponível em: <PM:8564467>.

JUNG, A. B.; BENNETT, J. P. Development of striatal dopaminergic function. I. Pre- and postnatal development of mRNAs and binding sites for striatal D1 (D1a) and D2 (D2a) receptors. *Developmental Brain Research*, v. 94, n. 2, p. 109–120, 1996.

KAVELAARS, A. *et al.* Changes in innate and acquired immune responses in mice with targeted deletion of the dopamine transporter gene. *Journal of*

Neuroimmunology, v. 161, n. 1–2, p. 162–168, 2005.

KEBABIAN, J. W.; CALNE, D. B. Multiple receptors for dopamine. *Nature*, v. 277, n. 5692, p. 93–96, 1979.

KEBABIAN, J. W.; GREENGARD, P. Dopamine-sensitive adenylyl cyclase: possible role in synaptic transmission. *Science (New York, N. Y.)*, v. 174, n. 4016, p. 1346–9, 1971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4332627>>.

KUMAZAWA, T. *et al.* Monoamine Oxidase Activities in Catfish (*Parasilurus Asotus*) Tissues. *Journal of Enzyme Inhibition*, v. 13, n. 5, p. 377–384, 1998. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/14756369809021483>>.

LAM, C. S.; KORZH, V.; STRAHLE, U. Zebrafish embryos are susceptible to the dopaminergic neurotoxin MPTP. *European Journal of Neuroscience*, v. 21, n. 6, p. 1758–1762, 2005.

LANGEN, M. *et al.* Fronto-striatal circuitry and inhibitory control in autism: Findings from diffusion tensor imaging tractography. *Cortex*, v. 48, n. 2, p. 183–193, 2012.

LAVDAS, A A *et al.* Serotonin promotes the differentiation of glutamate neurons in organotypic slice cultures of the developing cerebral cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 17, n. 20, p. 7872–80, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9315907>>.

LAVELLE, T. A. *et al.* Economic burden of childhood autism spectrum disorders. *Pediatrics*, v. 133, n. 3, p. e520-9, 2014. Disponível em: <<http://pediatrics.aappublications.org/content/early/2014/02/04/peds.2013-0763.abstract>>.

LI, X. *et al.* Regulation of mouse brain glycogen synthase kinase-3 by atypical antipsychotics. *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, v. 10, n. 1, p. 7–19, 2007. Disponível em: <http://journals.cambridge.org/abstract_S1461145706006547>.

LOTURCO, J. J. *et al.* GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron*, v. 15, n. 6, p. 1287–1298, 1995.

LYONS, D. J.; HELLYSAZ, A.; BROBERGER, C. Prolactin Regulates Tuberoinfundibular Dopamine Neuron Discharge Pattern: Novel Feedback Control Mechanisms in the Lactotrophic Axis. *Journal of Neuroscience*, v. 32, n. 23, p. 8074–8083, 2012. Disponível em: <<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.0129-12.2012>>.

MADRAS, B. K.; MILLER, G. M.; FISCHMAN, A. J. The dopamine transporter and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biological Psychiatry*, v. 57, n. 11, p. 1397–1409, 2005.

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

MISSALE, C. *et al.* Dopamine receptors: From structure to function. *Physiological Reviews*, v. 78, n. 1, p. 189–225, 1998.

MOK, E. Y. M.; MUNRO, A. D. Effects of dopaminergic drugs on locomotor activity in teleost fish of the genus *Oreochromis* (Cichlidae): Involvement of the telencephalon. *Physiology and Behavior*, v. 64, n. 3, p. 227–234, 1998.

MONEY, K. M.; STANWOOD, G. D. Developmental origins of brain disorders: roles for dopamine. *Frontiers in cellular neuroscience*, v. 7, n. December, p. 260, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3867667&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.

MONTAGU, K. A. Catechol compounds in rat tissues and in brains of different animals. *Nature*, v. 180, n. 4579, p. 244–245, 1957. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13451690>>.

MUELLER, T.; WULLIMANN, M. F.; GUO, S. Early teleostean basal ganglia development visualized by zebrafish *Dlx2a*, *Lhx6*, *Lhx7*, *Tbr2* (*eomesa*), and *GAD67* gene expression. *Journal of Comparative Neurology*, v. 507, n. 2, p. 1245–1257, 2008.

NICOTRA, A.; SENATORI, O. Some characteristics of mitochondrial monoamine oxidase activity in eggs of carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative biochemistry and physiology. C, Comparative pharmacology and toxicology*, v. 92, n. 2, p. 401–404, 1989. Disponível em: <<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med3&NEWS=N&AN=2565193>>.

NUSSLEIN-VOLHARD C, DAHM, R. *Zebrafish: A Practical Approach*. [S.l.: s.n.], 2002. v. Book 261.

NUTT, D. J. *et al.* The dopamine theory of addiction: 40 years of highs and lows. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 16, n. 5, p. 305–312, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25873042>>.

OBATA, T. *et al.* ISOELECTRIC ANALYSIS OF 3H-PARGYLINE-LABELLED MONOAMINE OXIDASE IN RAT AND CARP. v. 96, n. 1, p. 91–98, 1990.

POPOLO, M.; MCCARTHY, D. M.; BHIDE, P. G. Influence of dopamine on precursor cell proliferation and differentiation in the embryonic mouse telencephalon. *Developmental neuroscience*, v. 26, n. 2–4, p. 229–44, 2005. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1215465&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>>.

REIS, H. J. *et al.* Neuro-transmitters in the central nervous system & their implication in learning and memory processes. *Current medicinal chemistry*, v. 16, n. 7, p. 796–840, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19275596>>.

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

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, 2001.

RONDOU, P.; HAEGEMAN, G.; VAN CRAENENBROECK, K. The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties. *Cellular and molecular life*

sciences : CMLS, v. 67, n. 12, p. 1971–1986, 2010.

SCHMIDT, U. *et al.* Activation of dopaminergic D1 receptors promotes morphogenesis of developing striatal neurons. *Neuroscience*, v. 74, n. 2, p. 453–460, 1996.

SCHWEITZER, J. *et al.* Dopaminergic and noradrenergic circuit development in zebrafish. *Developmental Neurobiology*, v. 72, n. 3, p. 256–268, 2011.

SEEMAN, P. Targeting the dopamine D 2 receptor in schizophrenia. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, v. 10, n. 4, p. 515–531, 2006. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14728222.10.4.515>>.

SHARMA, A.; COUTURE, J. A Review of the Pathophysiology, Etiology, and Treatment of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD). *Annals of Pharmacotherapy*, v. 48, n. 2, p. 209–225, 2014.

SHEARMAN, L. P.; ZEITZER, J.; WEAVER, D. R. Widespread expression of functional D1-dopamine receptors in fetal rat brain. *Developmental Brain Research*, v. 102, n. 1, p. 105–115, 1997.

SHIN, J. T.; FISHMAN, M. C. FROM ZEBRAFISH TO HUMAN: Modular Medical Models. *Review Literature And Arts Of The Americas*, v. 3, n. 24, p. 311–340, 2002.

SOKOLOFF, P. *et al.* The dopamine D3 receptor: A therapeutic target for the treatment of Neuropsychiatric disorders. *CNS and Neurological Disorders-Drug targets*, v. 5, n. July 2016, p. 25–43, 2006.

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. 5512–5525, 2011.

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

SPENCER, G. E.; KLUMPERMAN, J.; SYED, N. I. Neurotransmitters and neurodevelopment - Role of dopamine in neurite outgrowth, target selection and specific synapse formation. *Perspectives on Developmental Neurobiology*, v. 5,

n. 4, p. 451–467, 1998. Disponível em: <<Go to ISI>://000079284600009>.

STEWART, A. M. *et al.* Zebrafish models for translational neuroscience research: From tank to bedside. *Trends in Neurosciences*, v. 37, n. 5, p. 264–278, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2014.02.011>>.

SUNAHARA, R. K. *et al.* Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature*, v. 350, n. 6319, p. 614–619, 1991.

SUNDSTROM, E. *et al.* Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. *Developmental Brain Research*, v. 75, n. 1, p. 1–12, 1993.

SVENNINGSSON, P. *et al.* DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annual review of pharmacology and toxicology*, v. 44, p. 269–296, 2004.

TAY, T. L. *et al.* Comprehensive catecholaminergic projectome analysis reveals single-neuron integration of zebrafish ascending and descending dopaminergic systems. *Nature communications*, v. 2, n. 1, p. 171, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21266970>\n<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3105308>>.

THIRUMALAI, V.; CLINE, H. T. Endogenous dopamine suppresses initiation of swimming in prefeeding zebrafish larvae. *Journal of neurophysiology*, v. 100, n. 3, p. 1635–1648, 2008.

VON TROTHA, J. W.; VERNIER, P.; BALLY-CUIF, L. Emotions and motivated behavior converge on an amygdala-like structure in the zebrafish. *European Journal of Neuroscience*, v. 40, n. July, p. 3302–3315, 2014.

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

YAMAMOTO, K. *et al.* Classification of Dopamine Receptor Genes in Vertebrates : Nine Subtypes in Osteichthyes. v. 2015, p. 164–175, 2015.