

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

LAURA ROESLER NERY

Efeito do tratamento com lítio sobre a habilidade motora e o sistema Wnt-catenina-caderina durante o desenvolvimento inicial de *Zebrafish*.

PORTO ALEGRE
2011

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

Efeito do tratamento com lítio sobre a habilidade motora e o sistema Wnt-catenina-caderina durante o desenvolvimento inicial de *Zebrafish*.

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular da
Pontifícia Universidade Católica do
Rio Grande do Sul.

Aluna: Laura Roesler Nery
Orientadora: Dr^a Mônica Ryff Moreira Roca Vianna

PORTO ALEGRE
2011

RESUMO

Lítio tem sido o principal tratamento para desordens bipolares desde 1950, oferecendo um efeito profilático e agudo contra os episódios maníacos e depressivos, apesar dos desafios encontrados na sua administração durante a gravidez e o período perinatal. Os mecanismos por trás dos efeitos do lítio ainda não foram descritos completamente mas existem evidências de um efeito sobre a via Wnt- β -catenina devido a sua capacidade de inibição sobre a GSK-3 β . Neste estudo nós avaliamos os efeitos da exposição ao lítio durante o desenvolvimento inicial de *Zebrafish* incluindo caracterizações comportamentais e moleculares do sistema Wnt- β -catenina-Caderina. Embriões foram tratados individualmente por 72hpf com LiCl 0.05, 0.5 e 5 mM. Não foram observadas malformações significativas nem efeitos embriotóxicos. Em 10 dpf animais tratados com 0.5 e 5 mM de lítio demonstraram habilidades locomotoras similares a síndrome induzida por lítio em humanos *Floppy baby syndrom*. Análises através da técnica de *Western blot* demonstraram uma expressão aumentada nos níveis de β -catenina e diminuída para N-caderina. Animais com 10dpf reestabeleceram seus níveis de expressão proteica de acordo com o controle. Análises através da técnica de qPCR não demonstraram nenhum efeito sobre os níveis de β -catenina ou N-caderina, sugerindo a ocorrência de mudanças pós-transcricionais. Enquanto os níveis de c-myc não foram alterados, houve uma diminuição nos níveis de Cyclin D1 em larvas de 3dpf, enquanto os níveis de CamkIV oscilaram.

ABSTRACT

Lithium has been the mainstream treatment for bipolar disorder since 1950s, offering unequivocal prophylactic and acute efficacy against maniac and depressive episodes despite challenges in managing bipolar disorder during pregnancy and the perinatal period. The mechanisms underlying lithium effects are still elusive but exacerbation of wnt- β -catenin signaling system due to GSK-3 inhibition is believed to be its main target. In this study we evaluated effects of lithium exposure during zebrafish early development including behavioral and molecular characterization of the wnt- β -catenin system. Embryos were individually treated for 72hpf with LiCl at 0.05, 0.5 and 5mM. No significant malformation and embryotoxic effects were observed. At 10dpf 0.5 and 5mM lithium-treated larvae showed decreased locomotory behavior resembling lithium-induced Floppy baby syndrome neurobehavioral symptoms. Western blot analysis of selected wnt- β -catenin system components showed an increased β -catenin and decreased N-cadherin protein levels at the end of treatment unaccompanied by wnt3a changes, reinforcing current view of GSK-3 inhibition as the main mechanism of lithium effects. At 10 dpf protein levels were reestablished on control levels for all previously treated groups. qPCR analysis of β -catenin and N-cadherin showed no effects of lithium on these genes expression suggesting protein changes were due to post-transcriptional events. While c-myc gene expression remained unaltered during evaluated periods, cyclin d1 was decreased at 3dpf, and CamkIV oscillated.

LISTA DE FIGURAS:

FIGURA 01 – Formação tubo neural Zebrafish	7
FIGURA 02 – Via Wnt- β -catenina	9
FIGURA 03 – Esquema Caderinas	10

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO 1.....	1
1.1 INTRODUÇÃO	2
1.1.1 <i>Lítio</i>	2
1.1.2 <i>Zebrafish</i>	4
1.1.3 <i>Desenvolvimento do Sistema Nervoso</i>	5
1.1.4 <i>Via de Sinalização Wnt</i>	7
1.1.5 <i>Caderinas</i>	9
1.2 JUSTIFICATIVA	11
1.3 OBJETIVOS.....	12
1.3.1 <i>Objetivos Específicos</i>	12
2. CAPÍTULO 2.....	13
2.1 ARTIGO CIENTÍFICO.....	I
3. CAPÍTULO 3.....	36
3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
REFERÊNCIAS.....	40
ANEXO 01	46

1. CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Lítio

O impacto de medicamentos e fármacos sobre a fisiologia vai além da preocupação que estes estejam cumprindo seu papel terapêutico. Estudos avaliando o potencial tóxico e efeitos secundários adversos de fármacos terapêuticos são cruciais na avaliação da segurança de seu uso, especialmente durante fases mais vulneráveis da vida do indivíduo. O desenvolvimento inicial humano em sua fase intrauterina é extremamente sensível e fármacos utilizados pela gestante podem afetar não apenas a saúde do embrião/feto momentaneamente, mas comprometê-lo de forma definitiva. Algumas patologias requerem tratamentos constantes e cujo regime não deve ser interrompido. Dentre estas, transtornos de humor envolvem um equilíbrio delicado entre riscos e benefícios do tratamento tanto para as mães quanto para o embrião/feto (KOZMA 2005).

O lítio vem sendo utilizado como principal fármaco no tratamento de transtorno bipolar desde 1950 (SALINAS & HALL 1999). Devido à importância do tratamento psiquiátrico para a saúde e vida das mães, muitas vezes o tratamento com lítio é mantido, ou mesmo recomendado em substituição ao uso de outros medicamentos com comprovado efeito teratogênico (KOZMA 2005). Nestes casos os níveis de lítio durante a gestação e período de amamentação são monitorados.

Apesar dos comprovados efeitos sobre o humor, as ações do lítio sobre o sistema nervoso variam de neuroproteção a neurotoxicidade (KOZMA 2005). Embora os dados sejam ainda mais escassos, o efeito da exposição pré- e neo-natal ao lítio sobre o sistema nervoso, contudo, parece ser mais danosa, conforme revisado por Kozma (2005). Fazendo uma revisão da literatura de 1978 a 2004 sobre os efeitos neurotóxicos e neurodesenvolvimentais do lítio, Kozma integrou achados de 30 pacientes que foram expostos ao lítio durante a gestação demonstrando uma série de prejuízos de distintas etiologias, e reforçando a necessidade de se estabelecer diretrizes sobre a administração de lítio a gestantes e adequado monitoramento dos níveis absorvidos pelo embrião/feto.

Estudos sobre o potencial teratogênico do lítio são controversos, especialmente devido à variedade de abordagens usadas e dificuldade de extrapolação dos achados para humanos. Em humanos, poucos relatos abrangem indivíduos que tenham sido expostos durante a gestação e analisados subsequentemente e demonstram que as anormalidades fetais resultantes do uso de lítio pela gestante são dependentes da frequência e da quantidade absorvida (SMITHBERG & DIXIT 1982; KOZMA 2005). Dentre as principais alterações descritas em humanos estão padrões comportamentais alterados, cianose, hipotonicidade, hipotireoidismo, diabetes insípida nefrogênica e problemas cardiovasculares (SCHOU & AMDISEN 1973; SCHOU *et al.* 1973; SCHOU 1976; NARS & GIRARD 1977; ANANTH 1978; MIZRAHI, HOBBS & GOLDSMITH 1979; JACOBSON *et al.* 1992; YONKERS *et al.* 2004). Estudos abrangentes e com condições monitoradas são cruciais para se estabelecer a segurança do tratamento com lítio em gestantes, especialmente devido a relatos de efeitos teratogênicos observados em invertebrados e vertebrados inferiores (WRIGHT, HOFFMAN & DAVIES 2005). Em ratos Wistar demonstrou-se que o lítio apresenta embriotoxicidade e teratogenicidade (MARATHE & THOMAS 1986).

A indicação atual de manutenção do tratamento com lítio pela gestante, acompanhado de monitoramento periódico da concentração plasmática do composto, é uma estratégia falha na prevenção de danos ao indivíduo em desenvolvimento. Esta estratégia ainda não é capaz de prever as concentrações de lítio alcançadas durante o desenvolvimento do novo indivíduo e portanto incapaz de estabelecer concentrações seguras de exposição (NEWPORT *et al.* 2005). Devido à passagem do lítio através da placenta, somada à imaturidade do sistema renal do embrião/feto resultando em uma meia-vida aumentada do composto, as concentrações de lítio em indivíduos cujas mães fazem uso do fármaco pode atingir níveis plasmáticos maiores do que aqueles identificados nas gestantes em um mesmo dado momento (STEVENS, BURMAN & MIDWINTER 1974).

Adicionalmente, em modelos animais este cátion também se mostrou efetivo na melhora de quadros associados a acidente vascular cerebral, Doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington, danos medulares e degeneração da retina (LENG *et al.* 2008). Em roedores adultos, o lítio reforça a estabilidade das moléculas responsáveis pela consolidação da memória, como a β -catenina (MAGUSCHAK & RESSLER 2008).

A administração de lítio por períodos prolongados em modelos animais

durante os processos de desenvolvimento ocasiona anormalidades ontogenéticas no indivíduo (KLEIN & MELTON 1996). Foi observado que em *Xenopus*, o lítio causa uma expansão da mesoderme dorsal levando a uma duplicação do eixo dorsal (KAO, MASUI & ELINSON 1986). Selderslaghs e colaboradores (2009) comprovaram que o lítio durante o processo de desenvolvimento embrionário em *Zebrafish* ocasiona retardo no desenvolvimento, demora na eclosão, deformidades no esqueleto e redução da capacidade natatória (SELDERSLAGHS *et al.* 2009).

Estudos recentes demonstraram que o lítio pode modular a via da *Wnt* agindo como um inibidor da GSK-3 β , evitando a fosforilação e degradação da β -catenina. Graças à ação inibidora do lítio sobre a GSK-3 β ocorre um aumento na concentração citoplasmática de β -catenina, favorecendo que esta se direcione ao núcleo e ative a transcrição de genes da via *Wnt* responsáveis pela migração e proliferação celular (KLEIN & MELTON 1996; STAMBOLIC, RUEL & WOODGETT 1996; SALINAS & HALL 1999; CHEN, DING & MACCORMICK 2000; GOULD & MANJI 2005; STUMP *et al.* 2006; LENG *et al.* 2008; DILL *et al.* 2008).

1.1.2 *Zebrafish*

Diferentes modelos animais vêm sendo adaptados para estudos que possam, ao mesmo tempo, diminuir o custo e manter uma complexidade de sistemas que permita a extrapolação dos achados para outros animais e humanos (LIESCHKE & CURRIE 2007; SPENCE *et al.* 2008). O teleósteo *Danio rerio*, mundialmente conhecido como *Zebrafish* foi descrito por Francis Hamilton em 1822. Pertencente à família Cyprinidae, uma das mais ricas em representantes entre os vertebrados, esta espécie tem distribuição geográfica endêmica no sul e sudeste da Ásia.

Proposto primeiramente como animal modelo por George Streissinger para pesquisas em biologia do desenvolvimento, o *Zebrafish* vem sendo utilizado por muitos anos, e é um dos principais modelos para estudos em genética, neurofisiologia e biomedicina (SPENCE *et al.* 2008). Devido ao seu pequeno porte, chegando no máximo de 120 milímetros de comprimento, é de fácil armazenamento, permitindo a acomodação de inúmeros animais em um mesmo aquário. Graças a vantagens como a

possibilidade de estudos genéticos em grande escala enquanto mantém a complexidade típica de um vertebrado, somadas a fácil manipulação e manutenção quando comparado aos modelos de vertebrados tradicionais, o *Zebrafish*, vem se estabelecendo como vantajoso modelo animal.

O *Zebrafish* se reproduz durante todo o ano, sendo capaz de originar centenas de ovos transparentes a cada ato reprodutivo. A fertilização e desenvolvimento exclusivamente externos de ovos relativamente grandes (cerca de 0,7 milímetros de diâmetro) e transparentes tornam a observação e a manipulação mais fácil do que nos demais animais modelo de vertebrado. Seu desenvolvimento embrionário completa-se em até 72 horas pós-fertilização (hpf), quando o ovo eclode dando origem a uma larva (SPENCE *et al.* 2008), o que facilita o acompanhamento da evolução dos processos em tempo real.

Kimmel *et al.* (1995) descreveu os estágios de desenvolvimento do *Zebrafish*, desde a formação do zigoto até a eclosão da larva, os estágios larvais e a formação do indivíduo adulto, possibilitando a identificação das distintas fases de formação do tecido nervoso.

1.1.3 Desenvolvimento do Sistema Nervoso

Após a fertilização, o embrião passa por processos de intensa proliferação celular, seguido de migração das novas células até seu comprometimento e diferenciação terminal. Estes processos que tem início com as clivagens são intensificados a partir do processo de gastrulação. Durante estes processos, as células que formam o embrião sofrem alterações tanto em nível de sinalização celular, graças à expressão de diferentes morfógenos, quanto em nível estrutural, em decorrência da expressão de distintas moléculas de adesão, por exemplo. Através dessas mudanças e da histocompatibilidade resultante, as células comprometem-se com diferentes destinos, dando, assim, origem a três folhetos embrionários: a endoderme, a mesoderme e a ectoderme.

A embriogênese do sistema nervoso tem início com o processo de neurulação, no qual, parte da ectoderme de revestimento é internalizada na forma de

tubo enquanto células próximas às suas extremidades laterais se desprendem, originando as células da crista neural (Figura 01), resultando na segregação dos respectivos precursores do sistema nervoso central e periférico (GILBERT 2000; GARCIA & GARCÍA 2001; WOLPERT *et al.* 2008). Durante esse processo, vias de sinalização celular como a via *Wnt*, que é responsável por ativar genes responsáveis pela proliferação e migração celular (GILBERT 2000; WOLPERT *et al.* 2008), assim como a expressão de fatores de crescimento, o bloqueamento de BMP (*bone morphogenic protein*), o que inibi a transformação da ectoderme em epiderme (DALE *et al.* 1992; JONES *et al.* 1992), e a via notch-delta, responsável por manter as células sem diferenciação neuronal (GILBERT 2000; WOLPERT *et al.* 2008), fazem com que ocorra um crescimento e aumento do número de células assim como um rearranjo na estrutura tecidual, formando a placa neural e posteriormente o tubo neural, que dará origem ao sistema nervoso.

Além da formação das células precursoras neurogliais, um evento crucial na formação da organização regional e periférica do sistema nervoso é o estabelecimento de sinapses. Este processo mediado por projeções de membrana dos neurônios recém originados é desempenhado de forma ativa pelo cone de crescimento axonal, que estabelece os primeiros contatos com os alvos neuronais com os quais poderão ser estabelecidas sinapses definitivas (GILBERT 2000; WOLPERT *et al.* 2008; CASTAÑO, GORDON-WEEKS & KYPTA 2010).

Várias moléculas participam de forma crítica dos processos de proliferação, migração, comprometimento e diferenciação, e que culminam com o estabelecimento de sinapses estáveis, condição crítica para a sobrevivência neuronal (GILBERT 2000; WOLPERT *et al.* 2008; CASTAÑO, GORDON-WEEKS & KYPTA 2010). Dentre os ligantes que participam ativamente deste processo estão as moléculas da família *Wnt* (TOLEDO, COLOMBRES & INESTROSA 2008; DILL *et al.* 2008; CHALPE *et al.* 2010), capazes de modular as atividades de proliferação, diferenciação e sinaptogênese graças a ativação e repressão de eventos intracelulares específicos através da modulação da expressão gênica (CLEVERS 2006; DILL *et al.* 2008; TOLEDO, COLOMBRES & INESTROSA 2008; SHITASHIGE, HIROHASHI & YAMADA 2008; CHALPE *et al.* 2010; VERHEYEN & GOTTARDI 2010). Moléculas de adesão celular como as Caderinas, por sua vez, desempenham papel importante no reconhecimento dos terminais sinápticos em formação. Estas proteínas são conhecidas por serem homofílicas, ligando-se exclusivamente entre elas, o que faz

com que o reconhecimento do cone axonal com o alvo seja específico para a formação de sinapses (TAKEICHI 1988; TAKEICHI 1995; ALBERTS *et al.* 2004; SHAN *et al.* 2004; LIEN, KLEZOVITCH & VASIOUKHIN 2006; MAGUSCHAK & RESSLER 2008).

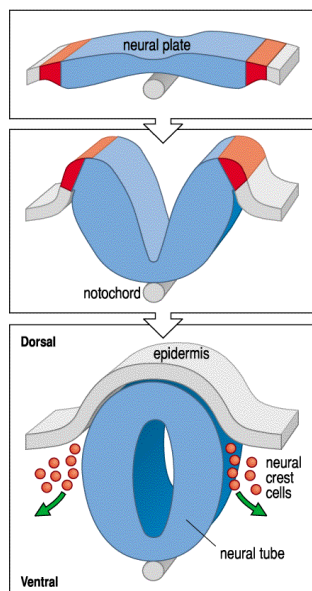


Figura 01 – Esquema ilustrando a posição da placa neural (do inglês *neural plate*) e demonstrando a formação do tubo neural (do inglês *Neural tube*) de vertebrados, o desprendimento das células da crista neural (do inglês *neural crest*) e a localização da epiderme (do inglês *epidermis*).
FONTE: Adaptado de WOLPERT, 2008.

1.1.4 Via de Sinalização Wnt

Wnt ou *Wingless* são proteínas conservadas evolutivamente responsáveis por diversos processos durante o desenvolvimento embrionário e a homeostase do indivíduo adulto. Sabe-se que esta família de proteínas são secretadas de forma parácrina ou autócrina, possuindo um raio de ação restrito, e regulando processos celulares variados em seus alvos (CLEVERS 2006; TOLEDO, COLOMBRES & INESTROSA 2008; VERHEYEN & GOTTARDI 2010).

Existem diferentes genes que codificam as proteínas desta família com distintos efeitos nas células e tecidos. Krylova e colaboradores (2002) demonstraram que tanto a Wnt3a quanto a Wnt7a induzem o crescimento e ramificação do cone axonal em neurônios sensoriais da espinha dorsal em camundongos (HALL, LUCAS & SALINAS 2000; PURRO *et al.* 2008; FARIÁS *et al.* 2010). Já a proteína Wnt4

induz o desenvolvimento do sistema nervoso central, incluindo a formação dos hemisférios cerebrais em mamíferos (LYUKSYUTOVA *et al.* 2003; FARÍAS *et al.* 2010). Wnt5a é responsável pela formação do botão pós-sináptico e manutenção das suas funções no Sistema Nervoso Central de camundongos adultos (FARÍAS *et al.* 2007; FARÍAS *et al.* 2010).

Essas proteínas já foram caracterizadas em diversos sistemas biológicos, incluindo camundongo, *Drosophila* e o *Zebrafish*. Foi demonstrado que a proteína Wnt3a é expressa em *Zebrafish* incluindo tecidos neurais em desenvolvimento, tecto óptico, cordão espinhal, e partes do encéfalo (CLEMENTS, ONG & TRAVER 2009).

Na ausência de Wnt um complexo formado por *Axin*, *adenomatous polyposis coli gene product* (APC) e Glicogênio Sintase Quinase 3-β (GSK-3β) acarreta a fosforilacao da β-catenina citosólica (LIU *et al.* 2002), resultando em sua poli-ubiquitinação e degradação pelo proteassomo (CLEVERS 2006; SHITASHIGE, HIROHASHI & YAMADA 2008; TOLEDO, COLOMBRES & INESTROSA 2008; CHAIROUNGDUA *et al.* 2010; VERHEYEN & GOTTARDI 2010). Desta forma, na ausência de Wnt os níveis de β-catenina citosolicos são mantidos baixos (Figura 03).

A ligação de Wnt ao seu receptor *Frizzled* e ao receptor relacionado a lipoproteína de baixa densidade resulta na ativação da proteína *Dishevelled* (Dvl) a qual sequestra os mediadores da ligação da GSK-3β a β-catenina, *Axin* e APC, inibindo a fosforilação da mesma, ocasionando a estabilização e acúmulo de β-catenina no citoplasma (CLEVERS 2006; SHITASHIGE, HIROHASHI & YAMADA 2008; TOLEDO, COLOMBRES & INESTROSA 2008; CHAIROUNGDUA *et al.* 2010; VERHEYEN & GOTTARDI 2010) e ativando a via canônica da Wnt (Figura 02).

A β-catenina é uma proteína que possui dois principais papéis dentro da célula, sendo localizada em dois *pools* intracelulares, um próximo à membrana plasmática e outro associado a vias de sinalização intracelular que a dirigem ao núcleo (TOLEDO, COLOMBRES & INESTROSA 2008; FARÍAS *et al.* 2010). Quando localizada próxima à membrana celular é responsável pela estabilidade de moléculas de adesão celular, como as Caderinas, fazendo a conexão entre o domínio intracelulares das caderinas e o citoesqueleto de actina (ALBERTS *et al.* 2004; NELSON & NUSSE 2004; SALINAS & PRICE 2005; LIEN, KLEZOVITCH & VASIOUKHIN 2006; MAGUSCHAK & RESSLER 2008). O *pool* citoplasmático/nuclear varia significativamente em quantidade, dependendo de seu

direcionamento ou não para a degradação proteossômica. Quando na presença de Wnt, a atividade constitutiva de GSK-3 β que leva à degradação de β -catenina é temporariamente inibida, e a catenina é direcionada para o núcleo ligando-se a fatores de transcrição gênica como o TCF/LEF induzindo a transcrição de genes responsáveis pela proliferação e migração celular (CHEN, DING & MCCORMICK 2000; NELSON & NUSSE 2004; CHAIROUNGDUHA *et al.* 2010). Entre os genes alvos deste complexo estão o fator de transcrição c-jun (MANN *et al.* 1999), o oncogene c-myc (HE *et al.* 1998), cyclin D1, responsável pelo controle do ciclo celular e da transcrição genica (TETSU & MCCORMICK 1999), a proteína anti-apoptótica survivin (ZHANG *et al.* 2001) e a calcio-calmodulina IV (Camk4) que por sua vez regula a expressão do fator CREB, crucial para plasticidade sináptica e neuroproteção (ARRÁZOLA *et al.* 2009; LEE *et al.* 2009).

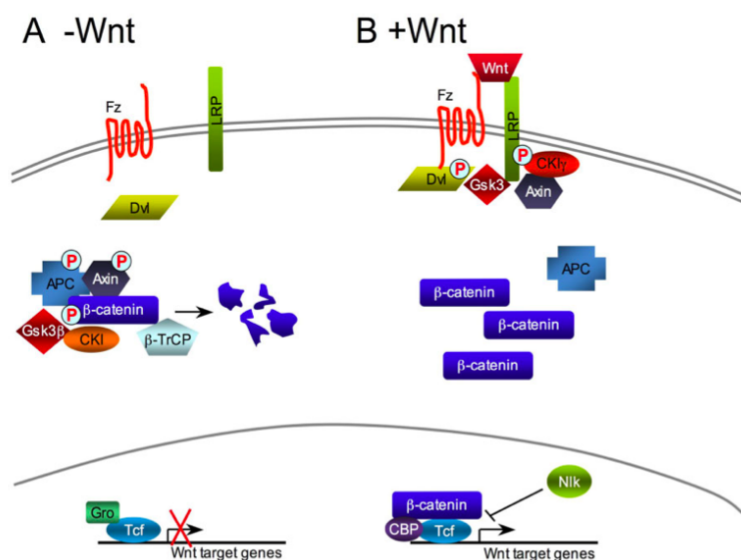


Figura 02 - Esquema ilustrando a via canônica da Wnt na ausência e presença de Wnt ligada ao receptor e seus efeitos no interior da célula.
 FONTE: VERHEYEN & GOTTARDI 2010.

1.1.5 Caderinas

A família das caderinas, composta por glicoproteínas dependentes de cálcio caracterizadas por domínios proteicos típicos, é responsável pela interação célula-célula de diferentes tecidos. As caderinas são subdivididas em caderinas clássicas, mais abundantes e melhor caracterizadas, não-clássicas e proto-caderinas

(STEINBERG & TAKEICHI 1994; FANNON & COLMAN 1996; SHAN *et al.* 2004). Estas moléculas participam do desenvolvimento e diferenciação do tubo neural em embriões de *Zebrafish* (BABB & MARRS 2004; MONTERO *et al.* 2004; SHIMIZU *et al.* 2005; LIEN, KLEZOVITCH & VASIOUKHIN 2006), assim como na estabilidade, formação e modulação de sinapses no sistema nervoso destes indivíduos quando adultos (MAGUSCHAK & RESSLER 2008).

Estas proteínas transmembrana comumente estão organizadas em dímeros e interagem de maneira homofílica através do domínio extracelular formando adesões com células adjacentes, enquanto se ligam ao citoesqueleto de actina na porção intracelular através de moléculas adaptadoras como as cateninas (TAKEICHI 1988; TAKEICHI 1995; ALBERTS *et al.* 2004; SHAN *et al.* 2004; LIEN, KLEZOVITCH & VASIOUKHIN 2006; MAGUSCHAK & RESSLER 2008) (Figura 03).

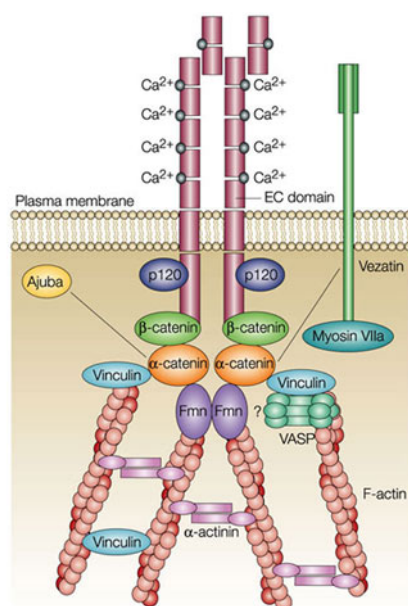


Figura 03 - Esquema ilustrando dois exemplares de caderina clássica organizados em forma de dímero ligados a outro par de moléculas de mesmo tipo e o domínio intracelular ligado ao citoesqueleto de actina por proteínas adaptadoras como a β-catenina.
 FONTE: KOBIELAK & FUCHS, 2004.

Entre as principais isoformas de caderinas clássicas existentes estão a caderina 1 típica de tecidos de origem epitelial, também conhecida como E-caderina, e a caderina 2 conhecida como caderina neural (N-caderina) por sua abundante distribuição no sistema nervoso, originalmente identificada em tecido cerebral de

roedores e pintos e que apresenta grande expressão em tecido embrionário (SHIRAYOSHI *et al.* 1986; TAKEICHI 1988; HIRAI *et al.* 1989; NOLLET, KOOLS & VAN ROY 2000).

Por serem responsáveis pela manutenção da estrutura sináptica, regulação na composição e intensidade das adesões, as caderinas são candidatas à mediadores de plasticidade sináptica, estando potencialmente envolvidos na sinaptogênese, remodelação dos terminais e alterações na eficiência da transmissão (ARIKKATH & REICHARDT 2008; MENDEZ *et al.* 2010).

1.2 JUSTIFICATIVA

Devido a capacidade de absorver as substâncias adicionadas ao seu meio, a complexidade típica de vertebrado e a transparência dos embriões e larvas durante os rápidos estágios de desenvolvimento do sistema nervoso, o *Zebrafish* tem sido apontado como um ótimo modelo animal para estudos de desenvolvimento e alterações estruturais e funcionais do sistema nervoso, bem como *screening* de efeitos farmacológicos.

Neste trabalho propomos o uso do tratamento com lítio durante o período de desenvolvimento inicial do *Zebrafish* a fim de caracterizar os efeitos deste íon na formação do sistema nervoso mediada por caderinas e os potenciais alvos responsáveis pelas alterações observadas no desenvolvimento.

1.3 OBJETIVOS

Caracterizar, em animais expostos a cloreto de lítio durante o desenvolvimento inicial, a capacidade motora e os efeitos sobre a via Wnt- β -catenina. Avaliando a expressão de β -catenina, Wnt e seus genes alvos, buscando relacionar estes achados com a expressão da molécula de adesão celular N-caderina e a capacidade natatória dos animais após o tratamento.

1.3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos embriotoxicológicos e teratogênicos durante as 72 horas de tratamento e até 10 dias pós fertilização;
- Avaliar a habilidade locomotora de larvas de 10 dias submetidas ao tratamento com lítio;
- Quantificar a expressão de RNA mensageiro, através da técnica de qRT-PCR, dos genes alvos da Via Wnt em larvas de 3dpf e 10 dpf;
- Quantificar a expressão de proteínas participantes da Via Wnt através da técnica de Western Blot, em larvas de 3dpf e 10pdf.

2. CAPÍTULO 2

2.1 ARTIGO CIENTÍFICO

Título: Neurobehavioral effects of early exposure to lithium on zebrafish and the Wnt- β -catenin signaling system.

Autores: Laura R. Nery, Talita C. Pereira, Laura D. Guerim, Lídia Martins, Mauricio R. Bogo and Monica R. Vianna.

Revista: Developmental Biology – Elsevier Science, San Diego, CA, USA.

Número do Manuscrito: DBIO11-189

Neurobehavioral effects of early exposure to lithium on zebrafish and the Wnt- β -catenin signaling system

Laura R. Nery¹, Talita C. Pereira², Laura D. Guerim¹, Lídia Martins¹, Maurício R. Bogo², Monica R. M. Vianna^{1,3,4§}

¹Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

²Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

³National institute for Translational Medicine (INCT-TM), 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴Zebrafish Neuroscience Research Consortium (ZNRC)

[§]Corresponding author

Prof. Monica R. M. Vianna, Ph.D.

Correspondence address:

Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Av. Ipiranga 6681, Prédio 12

90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: + 55 51 33534743

FAX: + 55 51 33203612

E-mail address: monica.vianna@pucrs.br

Abstract

Lithium has been the mainstream treatment for bipolar disorder since 1950s, offering unequivocal prophylactic and acute efficacy against maniac and depressive episodes. Its use during early pregnancy and the perinatal period remain controversial due to reports of deleterious effects on the newborn. The mechanisms underlying lithium therapeutic action are still elusive but exacerbation of wnt- β -catenin signaling pathway due to GSK-3 inhibition is believed to represent its main target. In this study we evaluated the effects of lithium exposure during zebrafish embryonic and early development including behavioral and molecular characterization of the wnt- β -catenin system. Embryos were individually treated for 72hpf with LiCl at 0.05, 0.5 and 5mM. No significant teratogenic and embryotoxic effects were observed. Western blot analysis at 3dpf of selected wnt- β -catenin system components showed increased β -catenin and decreased N-cadherin protein levels at the end of treatment, without significant changes in wnt3a, reinforcing the current view of GSK-3 inhibition as lithium's main target. At 10dpf 0.5 and 5mM lithium-treated larvae showed a dose-dependent decrease in locomotion, resembling lithium-induced Floppy baby syndrome neurobehavioral symptoms in humans. At this later period previously altered proteins returned to control levels in all treated groups, suggesting the neurobehavioral effects are likely a lasting consequence of lithium exposure. qPCR analysis of β -catenin and N-cadherin gene expression showed no effects of lithium at 3 or 10dpf, suggesting that protein fluctuations were likely due to post-transcriptional events. Other gene targets of the wnt signalling pathway were evaluated and only discrete alterations were observed. While c-myc expression remained unaltered, cyclin d1 was decreased at 3dpf, and CamKIV oscillated.

Keywords: lithium, motor behavior, β -catenin, N-cadherin, Wnt, zebrafish

1. Introduction

Lithium has been the paradigmatic treatment for bipolar disorder since 1950s, offering unequivocal prophylactic and acute efficacy against maniac and depressive episodes, despite the constant monitoring of patients Li^+ plasma levels required to reach effectiveness and avoid toxicity. The management of bipolar disorder during pregnancy and the perinatal period is specially challenging, and the conflict between therapy interruption related-relapse and the potential deleterious effects of continued therapy on development is accentuated by the lack of epidemiological studies supporting definitive management guidelines (Yonkers et al., 2004).

Li^+ is known to equilibrate across the chorionic membranes, and maternal and infant lithium levels had shown to be directly correlated with higher doses associated with more prominent perinatal complications (Newport et al., 2005). Lithium exposure during development has been associated with higher incidence of organ dysgenesis, in particular with cardiac malformations and Ebstein's anomaly, as well as renal and hepatic abnormalities (Schou et al., 1973; Schou and Amdisen, 1973; Jacobson et al., 1992; Cohen et al. 1994). Endocrinological and metabolic conditions such as infant diabetes insipidus and hypothyroidism have also been associated with lithium exposure during pregnancy and breast feeding (Schou, 1976; Nars and Girard, 1977; Ananth, 1978; Mizrahi, Hobbs and Goldsmith, 1979). The relative incidences of such effects are uncertain, and while more recent epidemiological data indicate that the teratogenic risk of first-trimester exposure is lower than previously suggested (Cohen et al., 1994), it is still substantial (Zegers and Andriessen, 2003). More information regarding lithium's effects and a better understanding of its mechanisms are critical to establish safe clinical management guidelines for woman with bipolar disorder of childbearing age or pregnant, especially during the critical embryological period (Cohen et al., 1994; Zegers and Andriessen, 2003).

In addition to the morphological and physiological teratogenic potentials described above, lithium has been associated with neurobehavioral effects in developing individuals. Collectively described as Floppy baby syndrome, depressed neurological function and/or neuromuscular deficiencies result in significant lethargy, hipotonicity, slower reflexes and respiratory difficulties in neonates exposed to lithium during development (Kozma 2005). The persistence of these effects has not been critically evaluated, but a developmental delay may be expected and could impact later life outcome.

Despite many decades of clinical use, the molecular targets involved in lithium mood stabilizing effects are only now being defined (Phiel and Klein, 2001). Lithium inhibitory effects on inositol monophosphatase (IMPase) and subsequent reduction in brain inositol were primary candidates to mediate lithium therapeutic effects, but despite efforts it has not been possible to directly demonstrate its contribution to mood stabilization (revised in Gould and Manji, 2005). For several decades, candidate mediators of lithium effects have been proposed, but no causal relations were established between these targets and lithium's effects on mood until recently. In 1996 lithium was shown to inhibit the ubiquitous glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) (Klein and Melton, 1996; Stambolic et al., 1996), and therefore to potentially affect the vast number of molecular targets this kinase has in neurons and glia (Jope and Johnson, 2004; Gould and Manji, 2005; Wada, 2009). Subsequent demonstrations linked lithium therapeutical doses to GSK-3 inhibition and mood stabilization, confirming GSK-3 as the main candidate do lithium thymoleptic effects involving modulation of brain plasticity and metabolism, monoaminergic signaling (Wu and Pan 2009; Wada 2009) and stem cell activity and neuroprotection (Willert et al. 2003; Toledo et al. 2008).

GSK-3 inhibition can directly mimic and exacerbate Wnt- β -catenin signaling system activation (Wada, 2009; MacDonald et al., 2009). The Wnt family of secreted glycoproteins is critically involved in brain development, acting as morphogens and controlling stem cell proliferation, cell fate determination and differentiation, migration, growth cone guidance, synaptogenesis and sustained synaptic plasticity through adulthood (revised in MacDonald et al., 2009; Fariás et al., 2010; Inestrosa & Arenas, 2010). This wide range of effects is mostly achieved by regulation of catenin-mediated gene expression of DNA-bound T cell factor/lymphoid enhancement factor (TCF/LEF) family of transcriptional factors in the canonical Wnt pathway.

In this study we evaluated the effects of lithium exposure on zebrafish development and the potential molecular targets of the wnt- β -catenin system involved in the characteristic neurobehavioral symptoms of lithium-affected babies observed in 10dpf larvae.

2. Methods

2.1 Animals breeding and maintenance

Zebrafish embryos were obtained from natural mating of adult *Danio rerio* (short-fin wild type) bred and maintained in an automated re-circulating tank system (Tecniplast, Italy). At the night before the breeding, males and females of reproductive age were placed in a breeding tank (Tecniplast, Italy) in a 2:1 ratio, respectively, separated by a transparent barrier. At 8 a.m., when the light went on, the barrier was removed and after 15 min the fertilized eggs were collected, washed with system water (reverse osmosis water equilibrated with salts) (Westerfield, 2000), freed of debris and transferred to sterile cell culture 96 wells dishes.

Embryos were individually placed in 96 wells plates (1 embryo for well, n=60 per group in triplicate) and submitted to 72 hours post-fertilization (hpf) treatment with system water (control groups) or lithium chloride (LiCl) (Synth) at 0.05 mM, 0.5mM and 5.0mM diluted in system water. Plates were maintained in an incubator at 28.5 °C on a 14:10 light/dark cycle and monitored daily.

At 72 hpf, 3 days post-fertilization (dpf) embryos were washed three times and placed in petry dishes with system water in groups of 30 larvae per dish. They were fed with paramecia twice daily starting at 4dpf and water was changed daily.

All the experiments were conducted according to the Canadian Council on Animal Care Guidelines on care and use of fish in research, teaching and testing (CCAC, 2005), followed Brazilian legislation (no. 11.794/08) and the Brazilian college of animal experimentation (COBEA) Guidelines (COBEA, 2008). Protocols were previously evaluated and approved by the Institutional Animal Care Committee (CEUA PUCRS, protocol 09/00129).

2.2. Embryotoxicity

Relative mortality rate, hatching efficiency and larvae general morphology were daily monitored during 10dpf, following Sederslaghs et. al. (2009). The hatching efficiency was observed up to 96hpf. Dead embryos were discarded immediately when detected. Morphological deformities in embryos or larvae were analyzed under an inverted microscope (Olympus SZ 4045).

2.3 Exploratory task

At 10dpf larvae were submitted to an exploratory task to evaluate their motor behavior when placed in a new environment. Animals individually placed in cell-culture 24 well dishes filled with 3ml of system water had their locomotion and exploratory behavior video-recorded during 3 min using a digital webcam (Quick cam pro 9000, Logitech). Data was analyzed using ANYmaze (Stoelting) in a designed protocol that virtually divided each 15 mm diameter well in central area (7.5 mm diameter) and periphery. The total travelled distance, number of head turns and crossings between the well central area and the periphery ring were considered the most relevant indicators.

2.4 Western Blot analysis

Whole-body tissue from 3 and 10dpf euthanized individuals (n = 15 per group) were placed in a cooled protease inhibitor solution (Complete Mini, Roche Applied Science) and stored at -80°C for subsequent analysis. The protein extract was prepared in RIPA buffer (Sigma-Aldrich). Twenty-five µg total protein was separated on a 7.5% SDS-polyacrylamide gel and transferred electrophoretically to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in TBS containing 0.05% Tween-20 and were incubated overnight with the following antibodies: β-actin (ab8224, Abcam) at 1:2000, β-catenin (C2206, Sigma-Aldrich) at 1:5000, N-cadherin (ab12221, Abcam) at 1:2000; Wnt3a (ab28472, Abcam) at 1:2000. Goat anti-mouse (G-21040, Molecular Probes) and goat anti-rabbit (G-21234, Molecular Probes) horseradish-conjugated secondary antibodies were used and detected using Western Lighting Western Blot Chemiluminescence (NEL 104001EA, Perkin Elmer). Pre-stained molecular weight protein markers (Benchmark marker, Invitrogen) were used to determine the detected bands' molecular weight and confirm antibodies target specificity.

Densitometry quantification of each replicated gel (n=3) was performed using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Total blotting protein levels of were normalized according to each sample's β-actin protein levels.

2.5 Real Time PCR analysis

RNA isolation and cDNA synthesis were performed as described in Rosemberg and collaborators (2007). In brief, whole 3 and 10 dpf (n=15 in triplicate)

larvae were frozen in liquid nitrogen and RNA was isolated with TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instruction. RNA purity was quantified spectrophotometrically calculating the ratio between the absorbance values at 260nm and 280nm and the samples were tested by electrophoresis in a 1.0% agarose gel with gelRed nucleic acid stain (Biotium). cDNA species were synthesized with SuperScriptTMIII First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, USA) (Rosemberg 2007).

For all genes, qRT-PCRs were performed using SYBR green (Tang et al., 2007). Standard reactions (25 μ l) were assembled as follows: 4 μ l of SYBR green qPCR supermix-UDG (Invitrogen), 0.25 μ l of forward primer (10 μ M), 0.25 μ l of reverse primer (10 μ M), 0.25 μ l of dNTPs (10mM), 1.5 μ l of MgCl₂ (50mM), 2.5 μ l of PCR buffer (10X), 3.7 μ l DEPC water, 0.05 μ l of Platinum TaqDNA 0.5U (Invitrogen) and 12.5 μ l of template. Templates were 1:50 diluted cDNA samples, and in the case of negative controls, cDNAs were replaced by DEPC water. The primers sequences were designed using the program Oligos 9.6 for the following genes: *ctnnb2*, *cdh2*, *camk4*, *myca* and *cnnd1*. The primers for the constitutive genes *bactin1*, *ef1a* and *rpl13a* (Table 1) were according from Tang (2007). Gene transcripts were obtained from the NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) and Ensembl databases (http://www.ensembl.org/Danio_erio). All real time assays were carried out in quadruplicate using an Applied Biosystems 7500 real-time PCR system. Forty amplification cycles were performed, with each cycle consisting of 94°C for 15 seconds followed by 60°C for 35 seconds. Amplification and dissociation curves generated by the software Applied Biosystems 7500 were used for gene expression analysis.

Cycle-temperature (Ct) values were obtained for each gene. Following the removal of outliers, raw fluorescence data were exported to the LinRegPCR 12.x (<http://LinRegPCR.HFRC.nl>) to determine the PCR amplification efficiency of each sample. PCR efficiency of each sample, together with Ct values, was used to calculate a relative gene expression value for each transcript, according to the equation $R = (E_{ref})^{CT_{sample}} \times (E_{sample})^{-CT_{sample}} \times (E_{sample})^{CT_{ref}} \times (E_{ref})^{-CT_{ref}}$, where E refers to PCR efficiency, Ct is the Ct value for each amplification, Ref is the value of the reference gene and sample to the gene in question (PFAFFI 2001).

2.6 Statistical analysis

Data was parametrically analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey post-hoc test. The level of significance was considered $p < 0.05$.

3. Results

No significant teratogenic or embryotoxic effects were observed when animals receiving lithium at 0.05, 0.5 or 5 mM were compared to control groups in the course of 10 dpf (data not shown). A significant 16% hatching deficiency was observed on animals treated with 5mM lithium when compared to controls.

When animals that were exposed to lithium during the initial 3dpf were behaviorally tested at 10 dpf, (i.e. after 7 days of treatment end), a significant dose-dependent locomotor deficit was observed (Figure 1). When individually allowed to explore a 15 mm diameter arena for 3 minutes, individuals treated with lithium at 0.5 and 5 mM travelled shorter distances when compared to untreated control ($p < 0.05$ and $p < 0.005$, respectively) or 0.05mM lithium animals ($p < 0.05$). The number of body rotations and crossings between the inner and outer arena areas were also reduced in animals treated with the higher lithium dose in relation to controls ($p < 0.005$).

Western blot analysis of β -catenin, N-cadherin and Wnt3a proteins immediately after the 72 hpf treatment (i.e. at 3 dpf) revealed increased β -catenin levels on 0.5 mM lithium-treated animals ($p < 0.005$) when compared to controls (Figure 2). In contrast, N-cadherin protein levels of 0.05 and 0.5mM lithium-treated animals were decreased when compared to control group ($p < 0.05$). The higher treatment dose (5 mM) did not significantly alter β -catenin or N-cadherin levels. We also evaluated Wnt3a protein levels after lithium treatment, and despite 0.05 and 0.5mM groups lower mean values, no statistically significant effect was observed when compared to control levels at 3dpf animals.

At 10 dpf, β -catenin, N-cadherin and Wnt3a protein levels were not altered in relation to control groups (Figure 2).

To better characterize the mechanisms underlying the altered protein levels observed in the western blot analysis and further explore the consequences of altered β -catenin and N-cadherin immediately after treatment, we analyzed β -catenin (*ctnnb2*) and N-cadherin (*cdh2*) gene expression at the same time periods. We also evaluated the transcription levels of three β -catenin target genes: c-myc (*myca*) and cyclin-d1 (*ccnd1*) and CamKIV (*camk4*) (Figure 3).

While expression of β -catenin and N-cadherin genes, evaluated at 3 or 10 dpf, was not affected by lithium, distinct effects were observed on the β -catenin target genes. Whereas c-myc remained unaffected on both time periods, cyclin D1 expression was significantly decreased on groups receiving 0.5 and 5 mM lithium at 3 dpf ($p < 0.05$), returning to control levels at 10 dpf. CamKIV expression was increased after 0.05 mM lithium treatment at 3 dpf ($p < 0.05$), but appeared to be generally decreased at 10 dpf in relation to control group, being significantly reduced at 0.5 mM ($p < 0.01$).

4. Discussion

The lithium concentrations chosen in this study were based on a 0.5mM concentration within the expected therapeutic maintenance blood levels, and included a lower, mood stabilizing ineffective but potentially neuroprotective dosage (Leng et al., 2008; Maguschak and Ressler, 2008) and higher, potentially toxic but still representative of lithium intoxication during therapy (Newport et al., 2005).

The observed absence of significant mortality or gross teratogenic effects of lithium exposure during early developmental stages are in accordance to lithium's current classification as a human low teratogenic agent (Cohen et al., 1994; Gentile, 2011). Previous studies using animal models including mice, rats and rabbits have shown a higher incidence of lithium-induced teratogenicity than those observed in humans, what was later attributed to excessively high doses and species specific sensitivities (discussed by Cohen and collaborators, 1994). The only equivalent study in zebrafish, performed by Selderslaghs et al. (2009) used broader period and concentration spectrums of lithium exposure and found similar effects at equivalent doses to those here presented. Importantly, they only observed significant embryotoxic effects after 72hpf of 235.9 mM lithium exposure, a concentration that in no circumstance would be reached on human therapy. Their observation of an 11.1% hatching deficiency after 72hpf 3.69mM lithium treatment is similar to the 16% deficit we observed on 5mM treated-group, reinforcing lithium's potential delaying development.

Despite its lack of teratogenic effects, and discrepancies in reports of other lithium-induced malformations, neurobehavioral effects in the newborn have been repeatedly reported (Kozma 2005). This is, to our knowledge, the first description of persistent symptoms that resemble the neurodevelopmental deficits including

hypotonicity and lethargy observed in lithium *Floppy baby* syndrome affected babies in model organisms. Newport et al. (2005) showed higher rates of CNS and neuromuscular complications and significantly lower Apgar scores in newborns exposed to higher lithium therapeutic doses. Animals treated with 0.5 and 5mM lithium showed impaired locomotion when compared to controls, moving slower, travelling shorter distances and with deficits in performing body turns. Importantly, these effects were observed in animals exposed to lithium concentrations within the lower limit of the therapeutic dose range (approximately 0.4-1.2mM). The neurodevelopmental deficits observed in human babies are commonly attributed to an acute effect of lithium intoxication during delivery, and there is no significant longitudinal studies evaluating symptoms resumption. Our results suggest that the persistent neurobehavioral effects may be a lasting consequence of lithium chronic exposure during the early developmental state.

GSK-3 inhibition can impact several signaling pathways, including growth factors cascades, but its most profound and direct impacts at therapeutic range is believed to be on Wnt- β -catenin system (Wada, 2009; MacDonald et al., 2009).

The Wnt family of secreted glycoproteins is critically involved in brain development and function through life, fundamentally directing cell proliferation, determination and differentiation, migration, growth cone guidance and synaptogenesis and plasticity (revised in MacDonald et al., 2009 and Farías et al., 2010). This wide range of effects is mostly achieved by regulation of catenin-mediated gene expression of DNA-bound T cell factor/lymphoid enhancement factor (TCF/LEF) family of transcriptional factors in the canonical Wnt pathway (revised in MacDonald et al., 2009).

Wnts are evolutionary conserved, and family members have complex and specific features not yet fully understood. Wnt3a was the first characterized Wnt protein in mammals, mostly due to its controlled secretion (Willert et al., 2003). In zebrafish the Wnt3 ortholog is broadly expressed in the developing nervous system beginning at the tailbud stage with a distribution pattern that closely resembles that of other vertebrates and capable of activating the Wnt canonical pathway (Clements et al., 2009). As reviewed in detail by MacDonald et al. (2009) and other recent publications (Clevers, 2006), the Wnt canonical pathway is activated when Wnt binds to frizzled (Fz or FZd) receptor and its low-density lipoprotein receptor-related protein co-receptor (LPR), forming a complex that recruits the scaffolding protein

disheveled (Dvl) and alters the activation state of the a multiple-protein complex called “Axin- or β -catenin destruction- complex” that includes another scaffolding protein, Axin, the tumor suppressor *adenomatous polyposis coli* gene product (APC), the casein-kinase 1 (CK1) and GSK-3. The Wnt-induced complex recruitment prevents GSK-3 phosphorylation of β -catenin residues and subsequent ubiquitination and rapid proteosomal degradation (Clevers, 2006; MacDonald et al., 2009). β -catenin has two intracellular pools, one anchoring the cell adhesion molecules Cadherins at the membrane, and a rapid turn-over cytoplasmic pool, that is prevented from moving to the nucleus in the absence of Wnt. β -catenin stabilization results in higher nuclear levels, association to TCF/LEF transcription factors and activation of gene expression. Wnt vast and constantly growing list of target genes are also diverse and context-specific (<http://www.stanford.edu/~rnusse/Wntwindow.html>), including cell cycle regulators that mediate proliferation, such as cyclin d1, oncogenes as c-myc and proteins related to migration and synaptic plasticity such as the CamKIV which is associated to synaptic plasticity and neuroprotection (He et al., 1998; Tetsu and McCormick, 1999; Arrázola et al., 2009; Lee et al., 2009;).

Lithium-mediated GSK inhibition also prevents β -catenin degradation and therefore mimics and potentially exacerbates Wnt effects during development. Aiming to better understand the underlying molecular network involved in lithium developmental effects, we analyzed protein and gene expression levels of the Wnt-catenin system components at the end of the 72 hpf treatment, i.e. at 3dpf, and again at 10 dpf, when motor deficits were observed.

As expected, at 3dpf, 0.5mM lithium treatment induced a robust increase in β -catenin protein levels, suggesting the exacerbation of the already active proliferative and migratory scenario expected at this early developmental stage period. This anti-apoptotic context may disfavor synaptic adhesion, justifying the reduced N-cadherin protein levels in 0.5mM treated animals despite β -catenin abundance. Gene expression of β -catenin and N-cadherin measured by qPCR were not altered at this time period, suggesting the protein level changes probably result from post-transcriptional events that may include a reduced degradation of β -catenin due to GSK-3 inhibition and either translation repression or active degradation of previously existing N-cadherin. Surprisingly, the higher treatment dose (5mM lithium) did not alter the measured parameters. Finally, despite a tendency that may reflect an endogenous negative feedback mechanism on Wnt secretion (Chairoungdua et al.,

2010), lithium did not significantly alter total Wnt3a protein level. Interestingly, at 10dpf, when the behavioral impact of lithium treatment was evident on larvae motor behavior, no changes in protein or gene expression of β -catenin, N-cadherin or Wnt3a was observed in relation to control groups.

Finally, the expression of the three chosen β -catenin system target genes at 3dpf were not markedly altered, but cyclin-d1 was statistically decreased in 0.5 and 5mM Li-treated animals in relation to controls, while CamKIV was increased at the 0.05mM concentration. Cyclin d1 is considered a key sensor and integrator of extracellular signals, modulating chromatin condensation of genes associated to cell proliferation and differentiation. Cyclin d1 has also been shown to regulate cell-matrix interaction independently of its effect on cycle progression reciprocally modulating migration through integrin and growth factor signaling (reviewed in Fu et al., 2004). Curiously, the CamKIV increased gene expression was the only effect of 0.05mM lithium concentration observed in this study, a dosage in which lithium may be affecting more significantly other targets than GSK-3 (Phiel and Klein, 2001). Lithium is known to have neuroprotective effects under low concentrations, and CamKIV is known to be involved in CREB phosphorylation and neuronal survival (Mbebi et al., 2002). Accordingly, Arrazola et al. (2009) showed that Wnt3a and lithium increase CamKIV gene expression and protects hippocampal neurons against Alzheimer's amyloid peptide toxicity. The reduced CamKIV levels observed at 10dpf in lithium-treated animals are intriguing, but may be related to a different scenario due to the later developmental period, in which cell proliferation and survival are probably less active in favor of other cellular events.

Other signaling systems than those related to GSK-3-inhibition may be involved in the persistent behavioral effects observed at 10dpf and a growing list of candidates are to be explored. It should also be considered that other targets of GSK-3 might account, at least partially, to the observed behavioral effects, and deserve to be investigated. Finally, despite wnt signaling system proeminence in the nervous system (Inestrosa & Arenas, 2010) the contribution of other tissues to the neurobehavioral and molecular effects of lithium cannot be ruled out without further analysis.

Conclusions

Our study reinforced previous evidence of lithium low teratogenic and embryotoxic effects within therapeutical ranges in humans and animal models

including zebrafish. Also in accordance to literature on the neurodevelopmental effects of lithium exposed babies, we have observed a prominent *neuromuscular* deficit in 10dpf larvae exposed to lithium during early developmental period at the 0.5mM concentration, which is within the lower levels of the therapeutic range. This is, to our knowledge, the first description of persistent symptoms that resemble the lithium Floppy baby syndrome in animal model organism. This effect is likely due to GSK inhibition and corroborated by increased β -catenin protein levels at the end of lithium treatment but the underlying cellular and molecular players affected remain to be fully characterized. Importantly, at 10dpf when the neurobehavioral effects were observed, lithium had already washed-out and molecular markers returned to basal levels, suggesting a permanent detrimental effect of lithium early exposure. Further investigations should focus both on the vast and constantly growing list of wnt- β -catenin system targets as in other signaling systems potentially affected by lithium.

Competing interests

There are no competing interests

Acknowledgements

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento 567483/2008-8) and by DECIT/SCTIE-MS through CNPq and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Proc. 10/0055-0 and 10/0036-5). We are thankful for received fellowships (M.R.V.: CNPq 305060/2009-0; L.M.: CNPq 504508/2007-5; L.R.N.: CAPES).

References

- Ananth, J., 1978. Side effects in the neonate from psychotropic agents excreted through breast-feeding. *Am. J. Psychiatry.* 135, 801-805.
- Arrázola, M.S., Varela-Nallar, L., Colombres, M., Toledo, E.M., Cruzat, F., Pavez, L., Assar, R., Aravena, A., González, M., Montecino, M., Maass, A., Martínez, S., Inestrosa, N.C., 2009. Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase type IV is a target gene of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *J. Cell. Physiol.* 221, 658-667.
- CCAC guidelines on: the care and use of fish in research, teaching and testing. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 2005, 94p.
- Chairoungdua, A., Smith, D.L., Pochard, P., Hull, M., Caplan, M.J., 2010. Exosome release of β -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J. Cell. Biol.* 190, 1079-1091.
- Clements, W.K., Ong, K.G., Traver, D., 2009. Zebrafish Wnt3 is expressed in developing neural tissue. *Dev. Dyn.* 238, 1788-1795.
- Clevers, H., 2006. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell.* 125, 469-480
- COBEA, Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Estatuto.**
<http://www.cobea.org.br>
- Cohen, L.S., Friedman, J.M., Jefferson, J.W., Johnson, E.M., Weiner, M.L., 1994. A reevaluation of risk of in utero exposure of lithium. *JAMA* 271,146-150
- Farias, G.G., Godoy, J.A., Cerpa, W., Varela-Nallar, L., Inestrosa, N.C., 2010. Wnt signaling modulates pre- and postsynaptic maturation: Therapeutic Considerations. *Dev. Dyn.* 239, 94-101.
- Fu, M., Wang, C., Li, Z., Sakamaki, T., Pestell, R. G., 2004. Minireview: Cyclin D1: Normal and Abnormal Functions. *Endocrinology* 145, 5439-5447.
- Gentile, S. 2011. Drug treatment for mood disorders in pregnancy. *Curr. Opin. Psychiatry.* 24, 34-40.
- Gould, T.D., Manji, H.K., 2005. Glycogen synthase kinase-3: a putative molecular target for lithium mimetic drugs. *Neuropsychopharmacology* 30, 1223-1237.
- He, T.C., Sparks, A.B.; Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T.; Morin, P.J., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 1998. Identification of c-myc as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509-1512.

- Inestrosa, N.C., Arenas, E. 2010. Emerging roles of wnts in the adult nervous system. *Nature Rev. Neurosci.* 11, 77-86.
- Jacobson, S.J., Jones, K., Johnson, K., Ceolin, L., Kauer, P., Sah, K., Konnenfeld, A.E., Rieder, M., Santelli, R., Smythe, J., Pastuszak, A., Einarson, T., Koren, G., 1992. Prospective multicentre study of pregnancy outcome after lithium exposure during first trimester. *Lancet* 339, 530-533.
- Jope, R.S., Johnson, G.V.W., 2004. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem. Sci.* 29, 95-102.
- Klein, P.S., Melton, D.A., 1996. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 8455-8459.
- Kozma, C., 2005. Neonatal Toxicity and Transient Neurodevelopmental Deficits Following Prenatal Exposure to lithium: Another Clinical Report and a Review of the Literature *American Journal of Medical Genetics.* Am. J. Med. Genet. 132, 441-444.
- Lee, K.H., Chatila, T.A., Ram, R.A., Thompson, R.F., 2009. Impaired memory of eyeblink conditioning in CaMKIV KO mice. *Behav. Neurosci.* 123, 438-442.
- Leng, Y., Liang, M., Ren, M., Marinova, Z., Leeds, P., Chuang, D., 2008. Synergistic Neuroprotective Effects of lithium and Valproic Acid or Other Histone Deacetylase Inhibitors in Neurons: Roles of Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibition. *J. Neurosci.* 28, 2576-2588.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., He, X., 2009. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev. Cell* 17, 9-26.
- Maguschak, K.A., Ressler, K.J., 2008. β -catenin is required for memory consolidation. *Nat. Neurosci.* 11, 1319-1326.
- Mbebi, C., Sée, V., Mercken, L., Pradier, L., Müller, U., Loeffler, J.P., 2002. Amyloid precursor protein family-induced neuronal death is mediated by impairment of the neuroprotective calcium/calmodulin protein kinase IV-dependent signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 20979-20990.
- Mizrahi, E.M., Hobbs, J.F., Goldsmith, D.I., 1979. Nephrogenic diabetes insipidus in transplacental lithium intoxication. *J. Pediatr.* 94, 493-495.
- Nars, P.W., Girard, J., 1977. Lithium carbonate intake during pregnancy leading to large goiter in a premature infant. *Am. J. of Disease Children*, 131, 924-925.

- Newport, J., Viguera, A.C., Beach, A.J., Ritchie, J.C., Cohen, L.S., Stowe, Z.N., 2005. Lithium placental passage and obstetrical outcome: Implications for clinical management during late pregnancy. *Am. J. Psychiatry.* 162, 2162-2170.
- Pfaffi, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time PT-PCR. *Nucleic Acid Res.* 29, 2003-2007.
- Phiel, C., Klein, P., 2001. Molecular targets of lithium action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 789–813.
- Rosemberg, D.B., Rico, E.P., Guidoti, M.R., Dias, R.D., Souza, D.O., Bonan, C.D., Bogo, M.R., 2007. Adenosine deaminase-release genes: Molecular identification, tissue expression. Pattern and truncated alternative splice isoform in adult Zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci.* 81, 1526-1534.
- Schou, M., 1976. What happened later to the lithium babies? A follow up study of children born without malformations. *Acta Psychiatr. Scand.* 54, 193-197.
- Schou, M., Amdisen, A., 1973. Lithium and pregnancy, 3: lithium ingestion by children breast-fed by women on lithium treatment. *Br. Med. J.* 2, 138.
- Schou, M., Goldfield, M.D., Weinstein, M.R., Villeneuve, A., 1973. Lithium and pregnancy, I: report from the Register of lithium Babies. *Br. Med. J.* 2, 135-136.
- Sederslaghs, I.W.T., Van Rompay, A.R., De Coen, W., Witters, H.E., 2009. Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Repro. Toxicol.* 3, 308-20.
- Stambolic, V., Ruel, L., Woodget, J.R., 1996. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics Wingless signaling in intact cells. *Curr. Biol.* 6, 1664-1668.
- Tang, R., Dodd, A., Lai, D., McNabb, W., Love, D., 2007. Validation of Zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 38, 384-90
- Tetsu, O., McCormick, F., 1999. B-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinomas cells. *Nature.* 398, 422-426.
- Toledo, E.M., Colombres, M., Inestrosa, N.C., 2008. Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation. *Prog. Neurobiol.* 86, 281-296.
- Wada, A., 2009. Lithium and Neuropsychiatric Therapeutics: Neuroplasticity via Glycogen Synthase Kinase-3 β , β -Catenin, and Neurotrophin Cascades. *J. Pharmacol. Sci.* 110, 14-28.

- Westerfield, M. 2000. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). Eugene: University of Oregon Press.
- Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R. 3rd., Nusse, R., 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*. 423, 448-452.
- Wu, D., Pan, W., 2009 GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signalling. *Trends Biochem. Sci.* 35, Issue 3, 161-168.
- Yonkers, K.A., Wisner, K.L., Stowe, Z.; Leibenluft, E., Cohen, L., Miller, L., Manber, R., Viguera, A., Suppes, T., Altshuler, L., 2004. Management of bipolar disorder during pregnancy and the postpartum period. *Am. J. Psychiatry*. 161, 608-620.
- Zegers, B., Andriessen P. Maternal lithium therapy and neonatal morbidity. *Eur. J. Pediatr.* 162, 348-349.

Tables

Table 1 - PRIMERS

Protein	Gene	Accession number	Primers (5' - 3')
β-catenin	ctnb2	NC_007130	F - ACGCTCAGGATCTGATGGAC R - AGGCACTTTCTGAACCTCCA
N-cadherin	cdh2	NC_007131	F - ACCAGGACTATGATTTGAGCCAGCTGC R - TGAAGTCTCCTATGTCTCCGGGATGTG
CamKIV	camk4	NC_007116	F - GTGCTCCAGAGATTCTGCGGGGATG R - GCATTGAGAGACACATTGTCCCACCAGG
c-myc	myca	NC_007126	F - CAACAGGCATGTGAAGCAGCGCAAG R - GCAGCTTTCTCGTTATTTGCGACCTC
cyclin D1	cnnd1	NC_007118	F - GCAGGCAGTGTGCTGCAGCGGTAC R - AGGGTCACTTCTGATGACTTGCGAGAGG
β-actin *	bactin1	ENSDART00000055194	F - CGAGCTGTCTTCCCATCCA R - TCACCAACGTAGCTGTCTTTCTG
Elongation factor 1 alpha *	ef1a	ENSDART00000023156	F - CTGGAGGCCAGCTCAAACAT R - ATCAAGAAGAGTAGTACCGCTAGCATTAC
Ribosomal protein L13 alpha *	rpl13a	NM_212784	F - TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC R - AGACGCACAATCTTGAGAGCAG

* Tang, R. et al. 2007 - Validation of Zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization.

Figure legends

Figure 1 - Behavioral effects of lithium exposure at 10dpf

Locomotion and exploratory effects of lithium exposure on 10dpf larvae.

Representative track-plots and behavior quantification (mean \pm SEM) of distance traveled during 3 minutes (a); number of rotations higher than 90° degrees (b); number of crossings between the inner and outer zones of the circular arena (c). ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ in relation to Control group using One-way ANOVA followed by Tukey post-hoc.

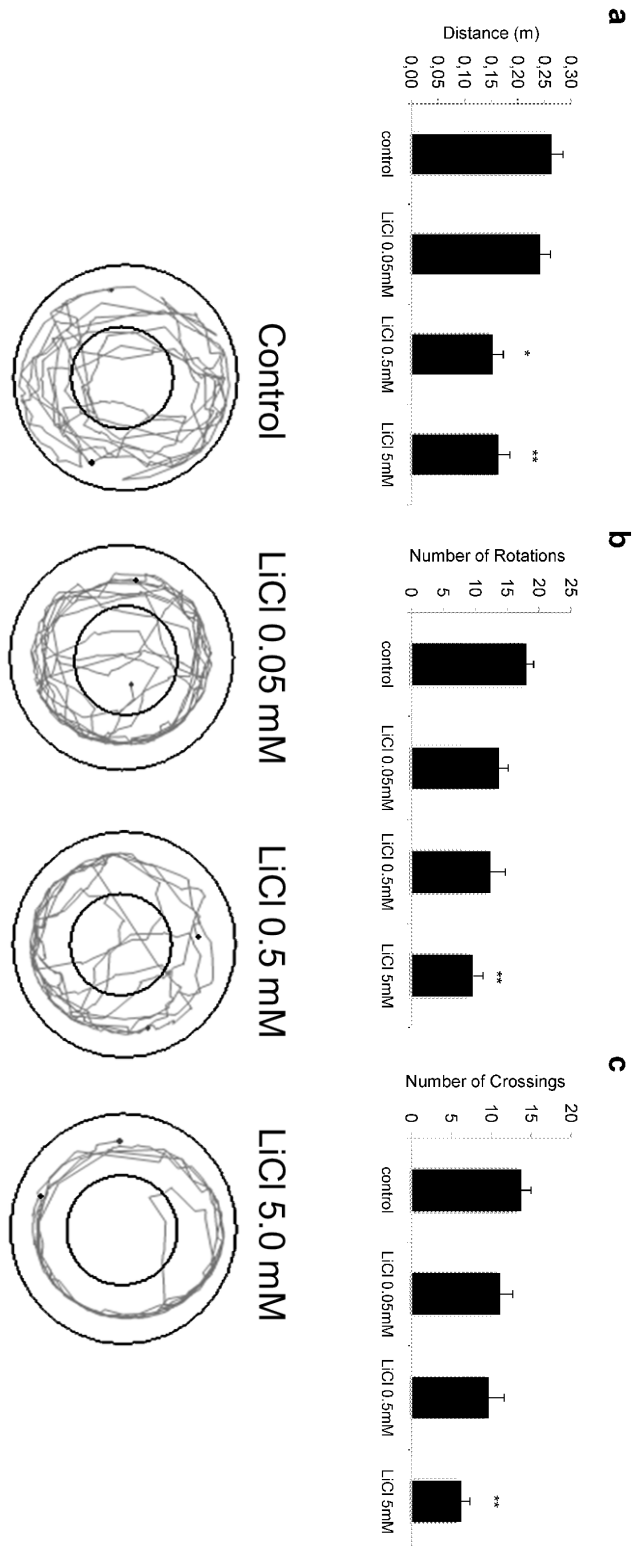
Figure 2 - Western blot analysis of β -catenin, N-cadherin and Wnt3a of 3dpf and 10dpf larvae exposed to lithium during the initial 72 hpf

Columns indicate mean \pm SEM values of β -catenin, N-cadherin and Wnt3a protein levels in relation to β -actin of 3dpf and 10 dpf individuals. ** indicates $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ compared to Control by One-way ANOVA followed by Tukey post-hoc.

Figure 3 - Relative mRNA expression of β -catenin (ctnnb2), N-cadherin (cdh2), C-myc (myca), cyclin D1 (cnnd1) and CamK IV (camk4) gene expression of 3dpf and 10dpf larvae exposed to lithium during the initial 72 hpf.

mRNA amount normalized to the average of 3 reference genes (β -actin, Efl α and Rpl13 α). Graphic representation based on specific sample efficiency independently and in quadruplicate. * indicates $p < 0.05$ compared to Control by One-way ANOVA followed by Tukey post-hoc.

Figure 1



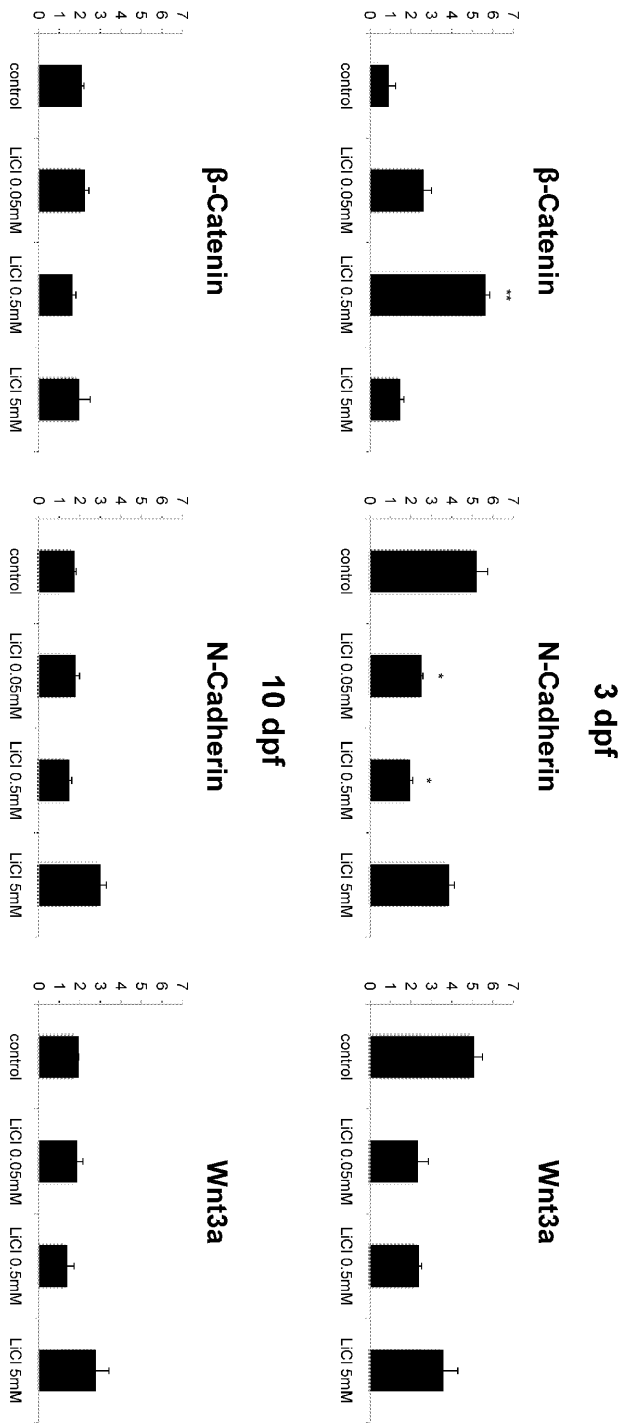
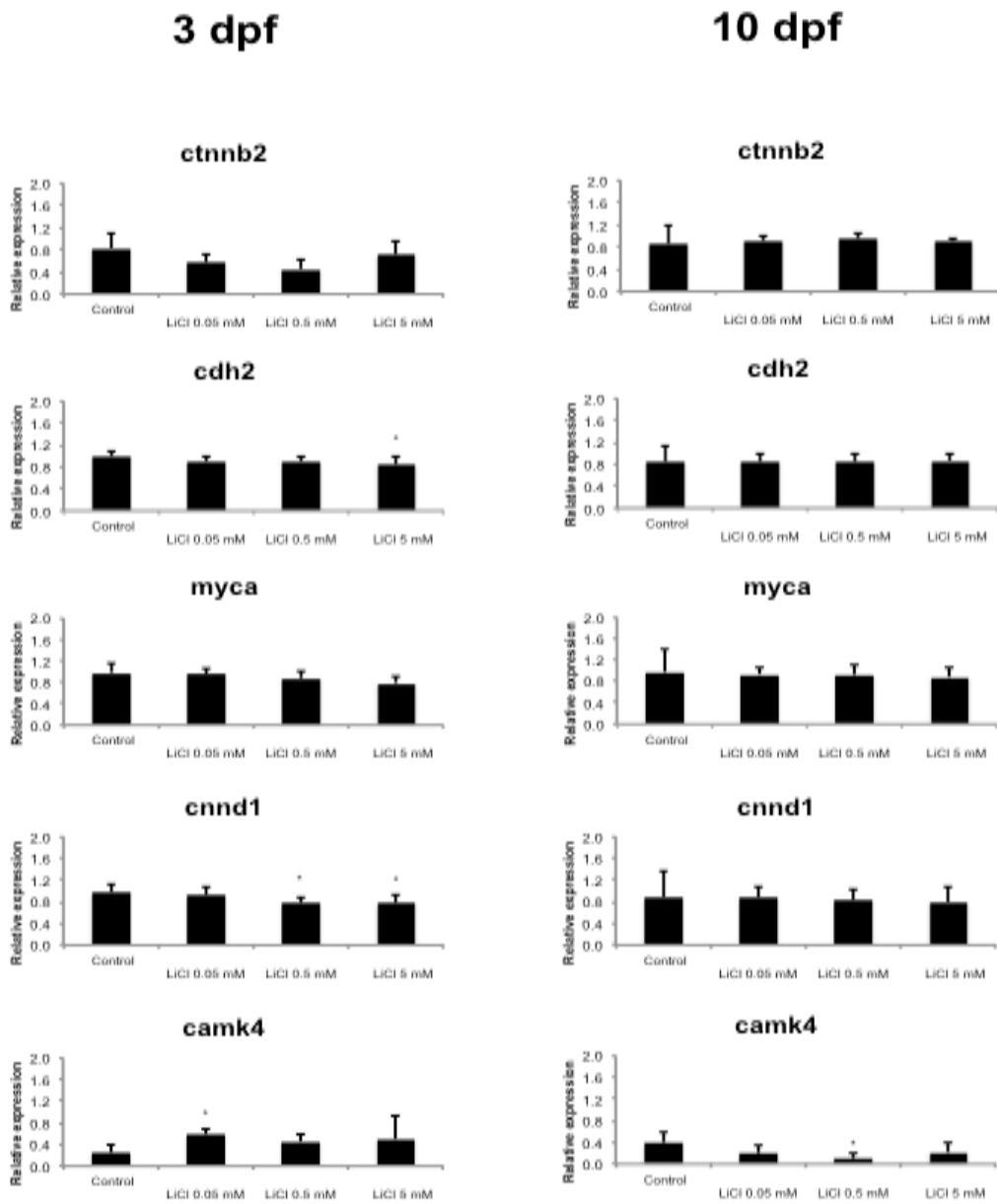


Figure 2

Figure 3



3. CAPÍTULO 3

3.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A exposição ao lítio durante o desenvolvimento é associada à incidência de malformações em humanos, como anomalias cardíacas e de Ebstein, renais e hepáticas, além de alterações endocrinológicas e metabólicas como diabetes insípido e hipotireoidismo (SHOU *et al.* 1973; SHOU 1976; NARS & GIRARD 1977; ANANTH 1978; MIZRAHI, HOBBS & GOLDSMITH 1979; JACOBSON *et al.* 1992). Além destes efeitos, alterações neurocomportamentais e motoras são comumente observadas em crianças que foram expostas ao lítio durante o desenvolvimento intrauterino. Estas alterações incluem letargia, hipotonicidade, reflexos lentos, e dificuldades respiratórias e são comumente descritas como *Floppy baby syndrome*, sendo atribuídas disfunções neurológicas e neuromusculares (KOZMA 2005). Apesar de prevalentes pouco se sabe sobre os mecanismos destas alterações sob ponto de vista tecidual, celular e molecular, e por consequência não é conhecida a evolução e eventuais consequências destas manifestações no desenvolvimento e amadurecimento neural.

Estudos anteriores com outros animais modelo incluindo ratos, camundongos e coelhos, utilizaram doses muito acima daquelas do espectro terapêutico e encontraram alterações teratogênicas não compatíveis com as da literatura em humanos. Neste estudo, onde utilizamos doses dentro do espectro terapêutico administrado em humanos, observamos uma baixa taxa de efeitos teratogênicos, o que corrobora com os dados em humanos, que levaram à atual classificação do lítio como um agente de baixa teratogenicidade apesar das discrepâncias nos dados epidemiológicos disponíveis (COHEN *et al.* 1994; GENTILE 2011). Estes achados reforçam o potencial do *Zebrafish* como animal modelo para *screenings* de fármacos com potenciais efeitos teratogênicos.

O único trabalho anterior em *Zebrafish* estudando eventuais efeitos teratogênicos, desenvolvido por Selderslaghs e colaboradores (2009) encontrou resultados equivalentes aos por nós encontrados, como baixa teratogenicidade e ausência de mortalidade nas doses até 5mM, e uma deficiência na capacidade de eclosão de 11,1% na dose de 3.69 mM, o que corrobora os nossos achados na dose de 5mM (16%).

Observamos através de análises comportamentais um déficit na habilidade locomotora dos animais tratados com 0.5 mM e 5 mM de lítio, com redução na distância percorrida, número de rotações e cruzamentos entre o centro e periferia da arena. É importante ressaltar que estes achados foram observados no limite mais baixo das concentrações sanguíneas de pacientes que utilizam o lítio como medicamento (variando entre 0.4 e 1.2 mM), demonstrando que este agente pode afetar significativamente a capacidade natatória dos animais.

Como o lítio afeta a atividade da enzima GSK-3 β inibindo a degradação de β -catenina, também avaliamos as alterações moleculares desta via. Como esperado em 3 dpf, houve um aumento nos níveis da proteína β -catenina, sugerindo um aumento na capacidade migratória e proliferativa das células neste período de desenvolvimento. Neste cenário migratório e anti-apoptótico, foi observada uma diminuição nos níveis de N-caderina. Chalpe e colaboradores (2010) demonstraram que a expressão de caderinas do tipo 7 e 11 é regulada pela via canônica da Wnt em células da crista neural de galinha quando tratadas com o ligante Wnt3a. Foi observado um aumento na expressão destas moléculas de adesão pró-migratórias. Os autores propõe que com a ativação de genes que aumentam a migração e proliferação celular, estas moléculas de adesão estariam sendo mais expressas na presença de um ativador da via canônica, como a Wnt3a, e que moléculas como a N-caderina e a E-caderina (anti-migratórias) estariam sendo inibidas ou degradadas para a facilitação deste processo. Foi demonstrado que a proteína Wnt3a regula a expressão de E-caderinas em tecido epitelial em camundongos (JAMORA 2003) e também induz a transição epitélio-mesenquimal inibindo a expressão de E-caderina, proteína característica de tecido epitelial (BERGE *et al.* 2008).

Os níveis de expressão gênica, medidos através de qPCR das moléculas de β -catenina e N-caderina não foram alterados, demonstrando que as alterações na quantidade de proteínas são devido a modificações pós-transcricionais. Devido à exposição ao lítio, podemos supor que o aumento da concentração citoplasmática de β -catenina foi devido a inibição da GSK-3 β ou degradação proteica ativa de N-caderinas pré-existentes. Apesar dos níveis de Wnt3a apresentarem um perfil refletindo um possível mecanismo de retro-inibição, não foi observada diferença significativa na quantidade de proteína Wnt3a durante o tratamento com lítio.

Após 10 dpf não foi observada nenhuma diferença significativa nos níveis proteicos desses alvos em relação ao controle, indicando que apesar das alterações na

capacidade motora destes animais foi afetada pela desregulação proteica durante o período do tratamento.

Juntamente com a análise dos genes de β -catenina e N-caderina, avaliamos a expressão de três genes alvos da via Wnt. Nenhum dos três genes teve sua expressão alterada significativamente. Foi observada uma diminuição estatisticamente diferente nas doses de 0.5 e 5 mM em relação ao controle para o gene de Cyclin D1. Isso pode ser devido a atividade de regulação da matriz extracelular, independente do seu efeito no ciclo celular, aumentando a capacidade migratória das células através de fatores de crescimento como as integrinas, o que possivelmente estaria diminuindo a expressão deste gene (FU *et al.* 2004). Ao contrário da expressão de Cyclin D1, os níveis aumentados de CamKIV foram o único efeito deste tratamento na dose de 0.05 mM, uma dose que potencialmente não teria nenhum efeito sobre a GSK-3 β (PHIEL & KLEIN 2001) mas como demonstrado anteriormente, o lítio possui ação neuroprotetora em doses baixas o que poderia estar envolvido nos efeitos da CamKIV com a fosforilação de CREB e também na sobrevivência neuronal (MBEBI & SÉE 2002). Estudos relacionam o aumento de CamKIV com a atividade da Wnt3a e do lítio, protegendo neurônios hipocâmpais adultos contra proteína β -amiloide, causadora da doença de Alzheimer (ARRÁZOLA *et al.* 2009). Em outro momento (10 dpf), onde os processos de migração e proliferação celular não estão mais tão ativos, os níveis de CamKIV apresentaram-se diminuídos, demonstrando a capacidade desta proteína de se relacionar com outras vias além da Wnt.

Estes dados reforçam a utilização do *Zebrafish* como animal modelo adequado para avaliar eventuais potenciais deletérios de fármacos sobre o desenvolvimento, e demonstram, pela primeira vez, a possibilidade de caracterização de fenótipos similares aos de crianças com *Floppy baby syndrome* em decorrência da exposição ao lítio. Estudos futuros que se dediquem à investigação de mais alvos dentre as centenas de genes cuja regulação é modulada pela via Wnt são necessários para a identificação dos mediadores dos efeitos encontrados. Adicionalmente outras vias potencialmente afetadas pelo lítio nas concentrações terapêuticas testadas devem ser exploradas.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1463p.

ANANTH, J. Side effects in the neonate from psychotropic agents excreted through breast-feeding. **The American Journal of Psychiatry**, v. 135, p. 801-805, 1978.

ARIKKATH, J.; REICHARDT, L.F. Cadherins and catenins at synapses: roles in synaptogenesis and synaptic plasticity. **Trends in Neuroscience**, v. 31, n. 9, p. 487-494, 2008.

ARRÁZOLA, M.S.; VARELA-NALLAR, L.; COLOMBRES, M.; TOLEDO, E.M.; CRUZAT, F.; PAVEZ, L.; ASSAR, R.; ARAVENA, A.; GONZÁLEZ, M.; MONTECINO, M.; MAASS, A.; MARTÍNEZ, S.; INESTROSA, N.C. Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase type IV is a target gene of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Journal of Cellular Physiology**, v.221, p.658-667, 2009.

BABB, S.G., MARRS, J.A. E-Cadherin Regulates Cell Movements and Tissue Formation in Early Zebrafish Embryos. **Developmental Dynamics**, v. 230, p. 263-277, 2004.

BERGE, D.T.; KOOLE, W.; FUERER, C.; FISH, M.; EROGLU, E.; NUSSE, R. Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies. **Cell Stem Cell**, v.3, n.5, p. 508-518, 2008.

CASTAÑO, Z.; GORDON-WEEKS, P.R.; KYPTA, R.M. The neuron-specific isoform of glycogen synthase kinase-3 β is required for axon growth. **Journal of Neurochemistry**, v. 113, p. 117-130, 2010.

CHAIROUNGDU, A.; SMITH, D.L.; POCHARD, P.; HULL, M.; CAPLAN, M.J. Exosome release of β -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. **Journal of Cell Biology**, v. 190, n. 6, p. 1079-1091, 2010.

CHALPE, A.J.; PRASAD, M.; HENKE, A.J.; PAULSON, A.F. Regulation of cadherin expression in the chicken neural crest by the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Cell Adhesion & Migration**, v.4, n. 3, p. 431-438, 2010.

CHEN, R.; DING, W.V.; MACCORMICKS, F.. Wnt Signaling to β -catenin Involves Two Interactive Components. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, n.23, p. 17894-17899, 2000.

CLEMENTS, W.K.; ONG, K.G.; TRAVER, D. Zebrafish *wnt3* is expressed in developing neural tissue. **Developmental Dynamics**, v. 238, p. 1788-1795, 2009.

CLEVERS, H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. **Cell**, v. 125, p. 469-480, 2006.

COHEN, L.S.; FRIEDMAN, J.M.; JEFFERSON, J.W.; JOHNSON, E.M.; WEINER, M.L. A reevaluation of risk of in utero exposure of lithium. **JAMA**, v. 271, p. 146-150, 1994.

DALE, L.; HOWES, G.; PRICE, B.M.J.; SMITH, J.C. Bone morphogenetic protein 4: A ventralizing factor in early *Xenopus* development. **Development**, v. 115, p.573-585, 1992.

DILL, J.; WANG, H.; ZHOU, F.; LI, S. Inactivation of glycogen synthase kinase 3 promotes axonal growth and recovery in the CNS. **The Journal of Neuroscience**, v.28, n.36, p. 8914-8928, 2008.

FANNON, A.M.; COLMAN, D.R. A model for central synaptic junctional complex formation based on the differential adhesive specificities of the cadherins. **Neuron**, v.17, n.3, p. 423-434, 1996.

FARÍAS, G.G; VALLÉS, A.S; COLOMBRES, M; GODOY J.A; TOLEDO, E.M; LUKAS, R.J; BARRANTES, F.J; INESTROSA, C.N. Wnt-7^a induces pre-synaptic colocalization of alpha7-nicotinic acetylcholine receptors and adenomatous polyposis coli in hippocampal neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 5313-5325, 2007.

FARÍAS, Ginny G.; GODOY, Juan A.; CERPA, Waldo; VARELA-NALLAR, Lorena; INESTROSA, Nibaldo C. Wnt signaling modulates pre- and postsynaptic maturation: Therapeutic Considerations. **Developmental dynamics**, v. 239, p. 94-101, 2010.

FU, M.; WANG, C.; LI, Z.; SAKAMAKI, T.; PESTELL, R. G. Minireview: Cyclin D1: Normal and Abnormal Functions. **Endocrinology**, v. 145, p. 5439-5447, 2004.

GARCIA, S.M.L.; GARCÍA, C.F. **Embriologia**. Porto Alegre: Artmed, 2001. 416p.

GENTILE, S. Drug treatment for mood disorders in pregnancy. **Curr Opin Psychiatry**, v. 24, p. 34-40, 2011.

GILBERT, S.F. **Developmental Biology**. Sunderland: Sinauer Associates, 2000. Disponível em : <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>> Acesso em : 20 de setembro de 2008.

GOULD, T.D.; MANJI, H.K. Glycogen synthase kinase-3: a putative molecular target for lithium mimetic drugs. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, p. 1223-1237, 2005.

HALL, A.C; LUCAS, F.R; SALINAS, P.C. Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by Wnt-7^a signaling. **Cell**, v. 100, p. 525-535, 2000.

HAMILTON, F. **An Account of the Fishes Found in the River Ganges and its Branches**. Edinburg: Archibald constable and company, 1822. 405 pp.

HE, T.C.; SPARKS, A.B.; RAGO, C.; HERMEKING, H.; ZAWEL, L.; DA COSTA, L.T.; MORIN, P.J.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Identification of c-myc as a target of the APC pathway. **Science**, v. 281, n. 5382, p. 1509-1512, 1998.

HIRAI, Y.; NOSE, A.; KOBAYASHI, S.; TAKEICHI, M. Expression and role of E- and P-cadherin adhesion molecules in embryonic histogenesis. **Development**, v. 105, p. 263-270, 1989.

JACOBSON, S.J.; JONES, K.; JOHNSON, K.; CEOLIN, L.; KAUER, P.; SAHN, K.; KONNENFELD, A.E.; RIEDER, M.; SANTELLI, R.; SMYTHE, J.; PASTUSZAK, A.; EINARSON, T.; KOREN, G. Prospective multicentre study of pregnancy outcome after lithium exposure during first trimester. **Lancet**, v. 339, p. 530-533, 1992

JAMORA, C.; DASGUPTA, R.; KOCIENIEWSKI, P.; FUCHS, E. Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. **Nature**, v. 422, n. 6929, p. 317-322, 2003.

JONES, C.M.; LYONS, K.M.; LAPAN, P.M.; WRIGHT, C.V.E.; HOGAN, B.L.M. DVR-4 (bone morphogenetic protein-4) as a posterior ventralizing factor in *Xenopus* mesoderm induction. **Development**, v. 115, p.639-647, 1992.

KAO, K.R.; MASUI, Y.; ELINSON, R.P. Lithium-induced respecification of pattern in *Xenopus laevis* embryos. **Nature**, v. 322, n. 6077, p. 371-373, 1986.

KIMMEL, C.B.; BALLARD, W.W.; KIMMEL, S.R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T.F. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. **Developmental dynamics**, v.203, p. 253-310, 1995.

KLEIN, P.S.; MELTON, D.A. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, n.16, p.8455-8459, 1996.

KOBIELAK, A.; FUCHS, E. α -catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, p. 614-625, 2004.

KOZMA, C. Neonatal Toxicity and Transient Neurodevelopmental Deficits Following Prenatal Exposure to Lithium: Another Clinical Report and a Review of the Literature *American Journal of Medical Genetics*. **American journal of medical genetics**, v. 132, p. 441-444, 2005.

KRYLOVA, O; HERREROS, J; CLEVERLEY, K.E; EHLER, E; HENRIQUEZ, J.P; HUGHES, S.M; SALINAS, P.C. Wnt-3, expressed by motoneurons, regulates terminal arborization of neurotrophin-3-responsive spinal sensory neurons. **Neuron**, v. 35, p. 1043-1056, 2002.

LEE, K.H.; CHATILA, T.A.; RAM, R.A.; THOMPSON, R.F. Impaired memory of eyeblink conditioning in CaMKIV KO mice. **Behavior Neuroscience**, v. 123, n. 2, p. 438-442, 2009.

LENG, Y.; LIANG, M.; REN, M.; MARINOVA, Z., LEEDS, P.; CHUANG, D. Synergistic Neuroprotective Effects of Lithium and Valproic Acid or Other Histone Deacetylase Inhibitors in Neurons: Roles of Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibition. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 10, p. 2576-2588, 2008.

LIEN, W.; KLEZOVITCH, O.; VASIOUKHIN, V. Cadherin-catenin proteins in vertebrates development. **Courent Opinion in Cell Biology**, v. 18, p. 499-506, 2006.

LIESCHKE, G.L.; CURRIE, P.D. Animal models os human disease: zebrafish swim into view. **Nature Reviews**, v. 8, p. 353-367, 2007.

LIU, C.; LI, Y.; SEMENOV, M.; HAN, C.; BAEG, G.H.; TAN, Y.; ZHANG, Z.; LIN, X.; HE, X. Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. **Cell**, v. 108, p. 837-847, 2002.

LYUKSYUTOVA, A.I; LU, C.C; MILANESIO, N; KING, L.A; GUO, N; WANG, Y; NATHANS, J; TESSIER-LAVIGNE, M; ZOU, Y. Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling. **Science**, v. 302, p. 1984-1988, 2003.

MAGUSCHAK, K.A.; RESSLER, K.J. β -catenin is required for memory consolidation. **Nature Neuroscience**, v. 11, n. 11, p.1319-1326, 2008

MANN, B.; GELOS, M.; SIEDOW, A.; HANSKI, M.L.; GRATCHEV, A.; ILYAS, M.; BODMER, W.F.; MOYER, M.P.; RIECKEN, E.O.; BUHR, H.J.; HANSKI, C. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. **The Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.96, n. 4, p. 1603-1608, 1999.

MARATHE, M.R.; THOMAS, G.P. Embryotoxicity and teratogenicity of lithium carbonate in Wistar rat. **Toxicology Letters**, v. 34, n. 1, p. 115-120, 1986.

MBEBI, C.; SÉE, V.; MERCKEN, L.; PRADIER, L.; MÜLLER, U.; LOEFFLER, J.P. Amyloid precursor protein family-induced neuronal death is mediated by impairment of the neuroprotective calcium/calmodulin protein kinase IV-dependent signaling pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 23, p. 20979-90, 2002.

MENDEZ, P.; DE ROO, M.; POGLIA, L.; KLAUSER, P.; MULLER, D. N-cadherin mediates plasticity-induced long-term spine stabilization. **Journal of Cell Biology**, v. 139, n. 3, p. 589-600, 2010.

MIZRAHI, E.M.; HOBBS, J.F.; GOLDSMITH, D.I. Nephrogenic diabetes insipidus in transplacental lithium intoxication. **The Journal of Pediatrics**, v. 94, n. 3, p. 493-495, 1979.

MONTERO, J.; CARVALHO, L.; WILSCH-BRAUNINGER, M.; KILIAN, B.; MUSTAFA, C.; HEISENBERG, C. Shield formation at the onset of zebrafish gastrulation. **Development**, v. 132, p.1187-1198, 2004.

NARS, P.W.; GIRARD, J. Lithium carbonate intake during pregnancy leading to large goiter in a premature infant. **American Journal of Disease of Children**, v. 131, n. 8, p. 924-925, 1977.

NELSON, W.J.; NUSSE, R. Convergence of Wnt, β -catenin, and Cadherin Pathways. **Science**, v.303, p. 1483-1487, 2004.

NEWPORT, J.; VIGUERA, A.C.; BEACH, A.J.; RITCHIE, J.C.; COHEN, L.S.; STOWE, Z.N. Lithium placental passage and obstetrical outcome: Implications for clinical management during late pregnancy. **American Journal of Psychiatry**, v.162, p.2162-2170, 2005.

NOLLET, F.; KOOLS, P.; VAN ROY, F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. **Journal of Molecular Biology**, v. 299, p. 551-572, 2000.

PURRO, S.A.; CIANI, L.; HOYOS-FLIGHT, M.; STAMATAKOU, E.; SIOMOU, E.; SALINAS, P.C. Wnt regulates axon behavior through changes in microtubule growth directionality: a new role for adenomatous polyposis coli. **Journal of Neuroscience**, v. 28, p. 8644-8654, 2008.

PHIEL, C.; KLEIN, P. Molecular targets of lithium action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, p. 789-813, 2001.

SALINAS, P.C.; HALL, A.C. Lithium and synaptic plasticity. **Bipolar Disorders**, v.2, p. 87-90, 1999.

SALINAS, P.C.; PRICE, S.R. Cadherins and catenins in synapse development. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 15, p. 73-80, 2005.

SCHOU, M. What happened later to the lithium babies? a followu study of children born without malformations. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 54, n. 3, p. 193-197, 1976.

SCHOU, M.; AMDISEN, A. Lithium and pregnancy, 3: lithium ingestion by children breast-fed by women on lithium treatment. **British Medical Journal**, v. 2, p. 138, 1973.

SCHOU, M.; GOLDFIELD, M.D.; WEINSTEIN, M.R.; VILLENEUVE, A. Lithium and pregnancy, I: report from the Register of Lithium Babies. **British Medical Journal**, v. 2, p. 135-136, 1973.

SELDERSLAGHS, I.W.T.; VAN ROMPAY, A.R.; DE COEN, W.; WITTERS, H.E. Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. **Reproductive Toxicology**, in press, 2009.

SHAN, W.; YAGITA, Y.; WANG, Z.; KOCH, A.; SVENNINGSSEN, A.F.; GRUZGLIN, E.; PEDRAZA, L.; COLMAN, D.R. The minimal essential unit for cadherin-mediated intercellular adhesion comprises extracellular domains 1 and 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 53, p. 55014-55923, 2004.

SHIMIZU, T.; YABE, T.; MURAOKA, O.; YONEMURA, S.; ARAMAKI, S.; HATTA, K.; BAE, Y.; NOJIMA, H.; HIBI, M. E-cadherin is required for gastrulation cell movements in zebrafish. **Mechanisms of Development**, v. 122, p. 747-763, 2005.

SHIRAYOSHI, Y.; HATTA, K.; HOSODA, M.; TSUNASAWA, S.; SAKIYAMA, F.; TAKEICHI, M. Cadherin cell adhesion molecules with distinct binding specificities share a common structure. **The EMBO Journal**, v. 5, n. 10, p. 2485 -2488, 1986.

SHITASHIGE, M.; HIROHASHI, S.; YAMADA, T. Wnt signaling inside the nucleus. **Cancer Science**, v. 99, n. 4, p. 631-637, 2008.

SMITHBERG, M.; DIXIT, P.K. Teratogenic effects of lithium in mice. **Teratology**, v.26, n.3, p.239-246, 1982.

SPENCE, R.; GERLACH, G.; LAWRENCE, C.; SMITH, C. The behavior and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 83, n.1, p. 13-34, 2008.

STAMBOLIC, V.; RUEL, L.; WOODGET, J.R. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics Wingless signaling in intact cells. **Current Biology**, v.6, n.12, p. 1664-1668, 1996.

STEINBERG, M.S.; TAKEICHI, M. Experimental specification of cell sorting, tissue spreading, and specific spatial patterning by quantitative differences in cadherin expression. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.91, n.1 p.206-209, 1994.

STEVENS, D.; BURMAN, D.; MIDWINTER, A. Letter: Transplacental lithium poisoning. **Lancet**, v. 2, n. 7880, p. 595, 1974.

STUMP, R.J.W.; LOVICU, F.J.; ANG, S.; PANDEY, S.L.; MCAVOY, J.W. Lithium stabilizes the polarized lens epithelial phenotype and inhibits proliferation, migration, and epithelial mesenchymal transition. **Journal of Pathology**, v.210, p. 249-257, 2006.

TAKEICHI, M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. **Development**, v. 102, p.639-655, 1988.

TAKEICHI, M. Morphogenetic roles of classic cadherins. **Current Opinion in Cell Biology**, v.7, n.5, p.619-627, 1995.

TETSU, O.; MCCORMICK, F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinomas cells. **Nature**, v. 398, n. 6726, p. 422-426, 1999.

TOLEDO, E.M.; COLOMBRES, M.; INESTROSA, N.C. Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation. **Progress in Neurobiology**, v. 86, p. 281-296, 2008.

VERHEYEN, E.M.; GOTTARDI, C.J. Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by protein kinases. **Developmental Dynamics**, v. 239, p. 34-44, 2010.


WOLPERT, L.; JESSEL, T.; LAWRENCE, P.; MEYEROWITZ, E.; ROBERTSON, E.; SMITH, J. **Princípios de Biologia do Desenvolvimento**. Porto Alegre: Artmed, 2008. 576p.

WRIGHT, T.L.; HOFFMAN, L.H.; DAVIES, J. Teratogenic effects of lithium in rats. **Teratology**, v. 4, n. 2, p. 151-155, 2005.

YONKERS, K.A.; WISNER, K.L.; STOWE, Z.; LEIBENLUFT, E.; COHEN, L.; MILLER, L.; MANBER, R.; VIGUERA, A.; SUPPES, T.; ALTSHULER, L. Management of bipolar disorder during pregnancy and the postpartum period. **American Journal of Psychiatry**, v. 161, p. 608-620, 2004.

ZHANG, T.; OTEVREL, T.; GAO, Z.; EHRLICH, S.M.; FIELDS, J.Z.; BOMAN, B.M. Evidence that APC regulates surviving expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. **Cancer Research**, v. 61, n. 24, p. 8664-8667, 2001.

ANEXO 01

 Você encaminhou esta mensagem em 28/3/2011 17:33.

Monica Ryff Moreira Vianna

De: ees.developmentalbiology.0.101cf1.8a2424ee@eesmail.elsevier.com em nome de Developmental Biology **Enviada:** seg 28/3/2011 17:30

Para: Monica Ryff Moreira Vianna; mrmvianna@yahoo.com

Cc:

Assunto: Submission Received

Anexos:

Title: Neurobehavioral effects of early exposure to lithium on zebrafish and the Wnt-<beta>-catenin signaling system

Corresponding Author: Dr. Monica R Vianna

Authors: Laura R Nery, M.Sc.; Talita C Pereira, M.Sc.; Laura D Guerim; Lídia Martins; Maurício R Bogo, Ph.D.;

Dear Dr. Vianna,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Developmental Biology.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Developmental Biology as an author:

<http://ees.elsevier.com/developmentalbiology/>

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your manuscript to Developmental Biology. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Kind regards,

Developmental Biology

Elsevier Science
525 B St., Ste. 1900
San Diego, CA 92101-4495 USA
tel: 619-699-6351
fax: 619-699-6211
db@elsevier.com