

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

FABIANO PERES MENEZES

Avaliação da sinalização glutamatérgica ao longo do desenvolvimento do peixe-zebra
(*Danio rerio*) e suas implicações comportamentais e motoras

ORIENTADORA: PROF^a Dr^a ROSANE SOUZA DA SILVA

Porto Alegre – RS

Janeiro, 2014

FABIANO PERES MENEZES

Avaliação da sinalização glutamatérgica ao longo do desenvolvimento do peixe-zebra
(*Danio rerio*) e suas implicações comportamentais e motoras

Dissertação apresentada como requisito
para a obtenção do grau de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do
Sul.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª ROSANE SOUZA DA SILVA

Porto Alegre – RS

Janeiro, 2014

FABIANO PERES MENEZES

Avaliação da sinalização glutamatérgica ao longo do desenvolvimento do peixe-zebra
(*Danio rerio*) e suas implicações comportamentais e motoras

Dissertação apresentada como requisito
para a obtenção do grau de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular da Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do
Sul.

Aprovada em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Carina Rodrigues Boeck

Prof. Dr. Diogo Losch de Oliveira

Prof. Dr. Diogo Rizatto Lara

Porto Alegre – RS

Janeiro, 2014

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que de certa forma contribuíram em toda minha trajetória até aqui. Agradeço aos meus colegas de laboratório por todo apoio durante esse tempo de ótima convivência. E principalmente agradeço a minha orientadora Rosane Souza da Silva por todo o tempo e empenho dedicados à árdua tarefa de orientar minha formação como pesquisador desde a graduação.

Não são as espécies mais fortes que sobrevivem nem as mais inteligentes, e sim as mais suscetíveis a mudanças.

Charles Darwin

Resumo

Distúrbios na sinalização glutamatérgica são propostos como a causa de inúmeras patologias do sistema nervoso. O peixe-zebra tem sido considerado um eficiente modelo na investigação das bases neuroquímicas de diversos transtornos, tais como a esquizofrenia e a epilepsia. Diversos sistemas de neurotransmissão já foram caracterizados em peixe-zebra, incluindo o sistema glutamatérgico. Além disto, um vasto repertório de respostas comportamentais a fármacos já foram caracterizados em especial em indivíduos adultos. Entretanto, pouca informação é disponível a cerca da capacidade de gerar resposta a clássicas drogas de ação glutamatérgica em fases iniciais do desenvolvimento em peixe-zebra. Ao longo do desenvolvimento, os receptores glutamatérgicos apresentam uma ordenada variabilidade entre as subunidades que os compõem, o que lhes confere diferentes propriedades farmacocinéticas e grau de afinidade por seus ligantes. Desta forma, neste trabalho foi analisado o perfil de resposta locomotora/comportamental do peixe-zebra ao antagonista glutamatérgico MK-801 em diferentes doses nas idades de 30, 60, 120 dias pós-fertilização (dpf) e 2 anos pós-fertilização(apf), bem como o efeito da pré-exposição à cafeína sobre os efeitos do MK-801. Adicionalmente, foi analisado o perfil de expressão das subunidades que compõem o receptor NMDA em cérebro total de peixe-zebra ao longo do desenvolvimento. A resposta locomotora ao ácido caínico (KA) também foi avaliada em diferentes doses nas idades de 7, 15 e 30 dpf. A pré-exposição ao ácido caínico em animais de 24 horas pós-fertilização (hpf) e 7 e 15 dpf foi confrontada pela exposição ao ácido caínico aos 2 meses de vida do peixe-zebra. Os resultados encontrados neste trabalho demonstram haver uma resposta idade-dependente na atividade locomotora do peixe-zebra, tanto para MK-801 quanto para ácido caínico. O pico de resposta locomotora ao MK-801 foi entre 60 e 120 dpf, o qual foi parcialmente prevenido pela pré-exposição à cafeína e foi capaz de alterar de forma idade-dependente o tempo no topo do aquário, utilizado como uma medida de ansiedade. A análise de expressão das subunidades dos receptores NMDA em cérebro de peixe-zebra demonstrou que as subunidades NR2C e NR2D possuem expressão tardia em relação às subunidades NR1, NR2A e NR2B. Os animais que foram expostos ao KA apresentaram alteração na atividade locomotora sem exibir características convulsivas clássicas. Entretanto, a pré-exposição ao KA aos 7dpf foi capaz de prevenir parcialmente os eventos convulsivos em resposta à injeção de KA (6 mg/Kg, i.p) aos 2 meses pós-fertilização.

Palavras chave: Peixe-zebra, Sistema Glutamatérgico, Desenvolvimento

Abstract

Disturbances in glutamatergic signaling have been proposed as the cause of many diseases of the nervous system. The zebrafish has been considered as an efficient model in the investigation of the neurochemical basis of various disorders, such as schizophrenia and epilepsy. Several neurotransmitter systems have been characterized in zebrafish, including the glutamatergic system. Moreover, a vast repertoire of behavioral responses to drugs has been characterized in particular in adults. However, little information is available about the ability to generate response to classic drugs of glutamatergic action in the early stages of development in zebrafish. Throughout development, ionotropic glutamate receptors have an orderly variability between the subunits that compose them, giving them different pharmacokinetic properties and degree of affinity for their ligands. In this way, we analyzed the locomotor/behavioral profile of zebrafish in response to the glutamate receptor antagonist, MK-801, in different doses in 30, 60, 120 days post-fertilization (dpf) and 2 years post-fertilization animals, as well the effect of caffeine pre-exposure on MK-801 action. Additionally, we analyzed the expression profile of subunits that comprise the NMDA receptor in whole brain of zebrafish during development. Locomotor/behavioral response to kainic acid (KA) was evaluated in different doses at ages 7, 15 and 30 dpf. Also, the pre-exposure to kainic acid in 24 hours post-fertilization (hpf) and 7 and 15 dpf animals was challenged by a second exposure to kainic acid at 2 months post-fertilization. The results demonstrated that zebrafish has an age-dependent response to MK-801 and kainic acid, at least on the locomotor/behavior aspects. The peak of locomotor response to MK-801 occurred at 60-120 days post-fertilization, which was partially prevented by caffeine and able to alter the time on upper zone of aquarium as a measure of anxiety. Analysis of gene expression of NMDA receptor subunits in zebrafish brain demonstrated that NR2C and NR2D subunits have later expression in comparison to subunits NR1, NR2A and NR2B. The animals that were exposed to KA showed alterations in locomotor activity without displaying classic convulsive characteristics. However, pre-exposure to 7dpf KA was able to partially prevent the seizure events in response to KA injection (6 mg / K) at 2 months post-fertilization.

Key words: Zebrafish, Glutamatergic system, Development

Índice de Figuras

Figura 1-Transportadores Glutamatérgicos	11
Figura 2- Subunidades que compõem o receptor NMDA.....	14
Figura 3 - Distribuição das subunidades NMDA em cérebro de camundongo	17

LISTA DE SIGLAS

HPF- horas pós-fecundação

DPF- dias pós-fecundação

MPF- mês pós-fecundação

APF- anos pós-fecundação

LTP- do inglês *Long-Term Potentiation*

LTD - do inglês *Long-Term Depression*

GAD - do inglês *glutamic acid decarboxylase*

EAATs - do inglês *Excitatory amino-acid transporters*

VGLUTs - vesicular glutamate transporters

mGluRs - receptores metabotrópicos

iGluR – receptores ionotrópicos

KA - do inglês *Kainic acid*

AMPA - ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiônico

NMDA - N-metil-D-aspartato

DPN - dias pós-nascimento

Sumário

Parte I	10
1 Introdução	10
1.1 Sistema Glutamatérgico	10
1.2 Ontogenia dos receptores Glutamatérgicos: NMDA e Caínico	14
1.3 Patologias associadas a distúrbios na sinalização glutamatérgica.....	17
1.4 Modelos animais baseados na ação do antagonista de receptor NMDA: MK-801	19
1.5 Modelos animais baseados na ação do agonista de receptor Caínico: Ácido Caínico	21
1.5 Justificativa	22
2 Objetivos	23
2.1 Objetivo Geral	23
Parte II.....	24
3 Resultados	24
3.1 Artigo Científico: Evaluation of age-dependent response to NMDA receptor antagonism in zebrafish. Menezes FP, Kist LW, Bogo MR, Bonan CD e Da Silva R. Artigo a ser submetido ao periódico Zebrafish - Mary Ann Liebert, Inc.	24
3.2 Artigo Científico: Tolerance to seizure induced by kainic acid is produced in a specific period of zebrafish development. Menezes FP, Rico EP e Da Silva RS. Artigo aceito para publicação no periódico <i>Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, Special Issue on Zebrafish Models</i> , 2014 Apr 15. pii: S0278-5846(14)00080-3. doi: 10.1016/j.pnpbp.2014.04.00.	42
Parte III	47
4 Discussão.....	47
5 Considerações Finais.....	49
Referências	50
ANEXO A – Parecer da banca examinadora	58

Parte I

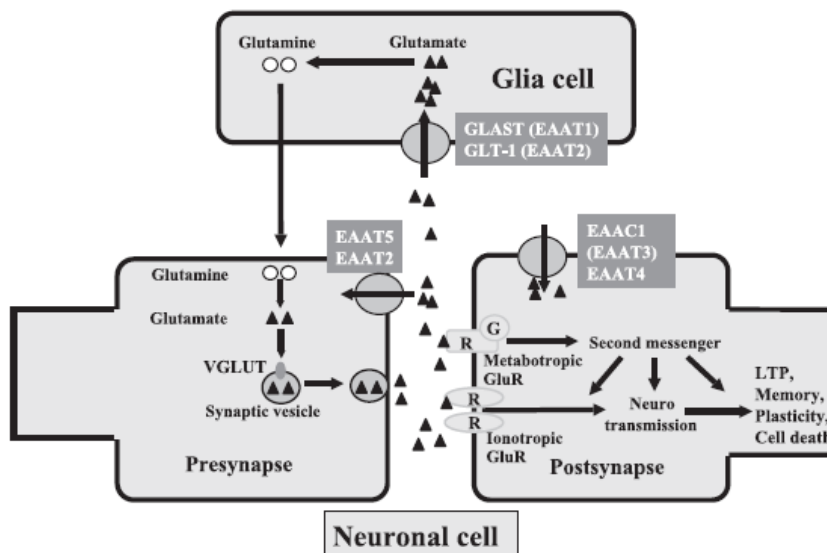
1 Introdução

1.1 Sistema Glutamatérgico

O glutamato é um aminoácido não essencial que possui importante papel no metabolismo celular, contribuindo como substrato do ciclo do ácido cítrico, ou no metabolismo de compostos nitrogenados através da desaminação, processo no qual libera seu grupo amina na forma de amônia. No sistema nervoso, o glutamato é o aminoácido livre de maior abundância, exercendo tanto funções metabólicas quanto de neurotransmissão (BROSNAN; BROSNAN, 2012). A síntese do glutamato pode ocorrer a partir de uma série de precursores, tais como, o α -cetoglutarato ou oxaloacetato provenientes do ciclo do ácido cítrico, da transaminação de outros aminoácidos e da ação da glutaminase (TYLICKI; BUNIK; STRUMILO, 2011). Embora não se possa determinar uma dessas vias como responsável específica para o montante do glutamato que atua como neurotransmissor, sabe-se que há uma diferença de concentração de glutamato de acordo com as porções do botão sináptico (NICHOLLS; ATTWELL, 1990). A porção intra-vesicular possui uma concentração de 100mM de glutamato, o que é dez vezes maior do que a encontrada no citosol de terminais pré-sinápticos (NICHOLLS; ATTWELL, 1990). O glutamato atuante na neurotransmissão é estocado em vesículas e tem sua liberação para a fenda sináptica dependente de Ca^{+} (NICHOLLS; SIHRA; SANCHEZ-PRIETO, 1987; WILKINSON; NICHOLLS, 1989). O glutamato é conhecido por ser o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso, participando em processos neurais de plasticidade sináptica, promoção de alterações de longa duração na excitabilidade neuronal, como o potencial de longa duração (LTP, do inglês *Long-Term Potentiation*) e a depressão de longa duração (LTD, do inglês *Long-Term Depression*), estando assim envolvido em funções como aprendizado e memória (MUKHERJEE; MANAHAN-VAUGHAN, 2012), além de estar envolvido em eventos relacionados à fase inicial do desenvolvimento da rede neural.

As concentrações de glutamato na fenda sináptica podem ser controladas por sua liberação via vesículas, processo que sofre grande influência de neuromoduladores como a adenosina, pela atividade de enzimas como a glutamato desidrogenase, glutamina sintetase e glutamato descarboxilase (GAD, do inglês *glutamic acid decarboxylase*) ou ainda pela recaptação do glutamato por transportadores específicos. Os transportadores de glutamato se dividem em duas classes, os VGLUTs são transportadores dependentes do gradiente eletroquímico de prótons, estão localizados nas membranas de vesículas e são responsáveis pelo armazenamento do glutamato em vesículas (NEALE; COPELAND; SALT, 2013; SHIGERI; SEAL; SHIMAMOTO, 2004). Os transportadores de aminoácidos excitatórios dependentes de sódio (EAATs, do inglês *Excitatory amino-acid transporters*) são responsáveis por auxiliar no termino do sinal e na manutenção das concentrações de glutamato (BELLOCCHIO et al., 2000). Os EAATs são localizados na membrana plasmática de neurônios e células da glia e, conforme suas afinidades por substratos específicos e sensibilidade para inibidores, são classificados nos sub-tipos EAAT1-5 (O'SHEA et al., 2002; ZERANGUE; KAVANAUGH, 1996) (Figura 1).

Figura 1-Transportadores Glutamatérgicos



Fonte: (SHIGERI; SEAL; SHIMAMOTO, 2004)

Nota: Transporte de glutamato na fenda sináptica. EAATs (excitatory amino acid transporters:), VGLUTs (vesicular glutamate transporters).

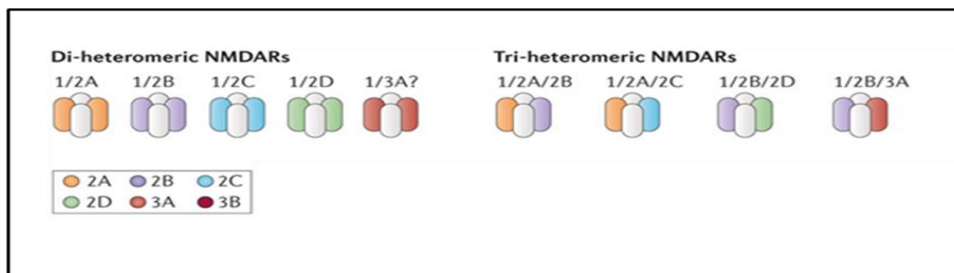
A ação de neurotransmissão do glutamato dá-se pela sua ligação a receptores presentes na membrana dos terminais sinápticos, estes estão categorizados em duas classes distintas; metabotrópicos e ionotrópicos. Os receptores metabotrópicos (mGluRs), são compostos por polipeptídios que possuem sete domínios transmembranas e são classificados em oito subtipos de acordo com seu segundo mensageiro. Os mGluRs são acoplados à proteína G e transmitem seu sinal de forma indireta através de segundo mensageiro, tais como a fosfolipase C e o AMPc (BERTRAND et al., 2002). Sua ativação resulta na modulação de uma variedade de funções celulares, incluindo o fluxo de corrente através dos canais iônicos (CHU; HABLITZ, 2000). Os receptores glutamatérgicos do tipo ionotrópicos (iGluR) são ligados a canais catiônicos não seletivos que permitem o fluxo de K^+ , Na^+ e Ca^{2+} , em resposta ao glutamato, mediando assim a vasta maioria da transmissão excitatória no cérebro (LOPACHIN et al., 2001). Os iGluR estão divididos em três classes de acordo com sua farmacologia e sua estrutura molecular: cainato, AMPA e NMDA. Suas nomenclaturas são baseadas em seus agonistas farmacológicos de ligação específica: Ácido cáinico (KA, do inglês *Kainic acid*), Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiônico (AMPA) e N-metil-D-aspartato (NMDA) (MELDRUM, 2000). Os iGluR estão presentes em terminais pós-sinápticos e quando ativados pelo ligante estimulam a abertura de um canal iônico e a passagem dos íons provoca uma corrente pós-sináptica excitatória que varia em velocidade e duração de acordo com o iGluR ativado (OZAWA; KAMIYA; TSUZUKI, 1998).

Os receptores cáinicos são ligados a canais permeáveis a cátions que são ativados por baixas concentrações de ácido cáinico e que exibem ativação rápida e característica dessensibilização. Estes receptores são tetrâmeros compostos por arranjos de cinco subunidades (KA1, KA2, GluR5, GluR6 e GluR7). A composição dos receptores pode variar conforme a estrutura cerebral em que está localizado (WERNER et al., 1991; WILDING; HUETTNER, 2001; WILDEN; SEEBURG, 1993). Receptores do tipo cainato não possuem uma distribuição cerebral tão ampla quanto os receptores AMPA e NMDA e, geralmente, estão co-localizados com estes (PINHEIRO; MULLE, 2006). Entretanto, há casos em que a neurotransmissão é de exclusividade dos receptores cáinicos (HUETTNER, 2003; LEE; LEE; JEON, 2012). Nas porções pós-

sinápticas, os receptores cáinicos contribuem para as correntes excitatórias mesmo que em menor escala (CASTILLO; MALENKA; NICOLL, 1997; MULLE et al., 1998), já nos terminais pré-sinápticos podem agir como moduladores da liberação de neurotransmissores como GABA e glutamato (HUETTNER, 2003), sendo este papel modulador dependente da concentração dos seus ligantes na fenda sináptica (DUNCAN et al., 2011; GISABELLA; BOLSHAKOV; BENES, 2012; SCHMITZ; MELLOR; NICOLL, 2001). Mesmo sendo um tipo de receptor ionotrópico, o receptor cáinico dispara ações metabotrópicas através da ativação de Proteína G e subsequente ativação de Proteínas Quinase A e C (RODRÍGUEZ-MORENO; SIHRA, 2007).

Os receptores NMDA são caracterizados pelo bloqueio voltagem-dependente exercido pelo Mg^{2+} extracelular (JOHNSON; ASCHER, 1990), pelos sítios de alta e baixa afinidade por Ca^{+2} (LIU; VON EULER, 1999) e pela menor atividade cinética em relação aos receptores AMPA (LESTER et al., 1990). Além disso, para exercer suas funções é necessária a co-ativação por dois ligantes: glutamato e glicina. Os receptores NMDA formam heterômeros compostos por duas subunidades do tipo NR1 e duas subunidades do tipo NR2 ou NR3 ou ambas. A subunidade NR1 possui oito variações produzidas por *splicing* alternativo (NR1A, NR1B, NR2A, NR2B, NR3A, NR3B, NR4A e NR4B), a subunidade NR2 possui quatro isoformas (NR2A-NR2D) e a subunidade NR3 duas (NR3A e NR3B) (SIMEONE; SANCHEZ; RHO, 2004; STEPHENSON, 2006). O receptor NMDA pode apresentar diferentes propriedades conforme a combinação das subunidades NR2 que irão compor o receptor NMDA em conjunto com as subunidades NR1 (KUTSUWADA et al., 1992). Os receptores NMDA estão amplamente distribuídos em todo o sistema nervoso, com uma maior concentração na região do hipocampo, sendo um dos receptores de neurotransmissores mais fortemente regulado (OZAWA; KAMIYA; TSUZUKI, 1998) (Figura 2).

Figura 2- Subunidades que compõem o receptor NMDA



Fonte: (GIELEN et al., 2009)

Nota: Exemplos de possíveis arranjos entre as subunidades para formação do receptor NMDA.

1.2 Ontogenia dos receptores Glutamatérgicos: NMDA e Caínico

Durante a fase inicial de desenvolvimento do cérebro pode-se destacar processos como proliferação, migração, organização morfo-funcional e sinaptogênese. O glutamato, assim como o GABA, desempenha um papel fundamental, agindo como um fator parácrino, sendo liberado no meio extracelular de forma não convencional, ou seja, não envolvendo uma comunicação sináptica, e se difundindo de forma a atuar na maturação e migração neuronal (MANENT et al., 2005). A modulação da migração exercida por esse neurotransmissor parece estar relacionada ao estabelecimento de gradientes morfogênicos que guiam a migração dos neuroblastos para a região alvo, ou criando um substrato permissivo para migração, dando ao neuroblasto condições necessárias para mobilidade (MANENT et al., 2005, 2006). A presença de receptores específicos em determinadas regiões auxilia no tipo de migração que ocorrerá. Os receptores NMDA atuam em especial em migrações radiais de células piramidais do hipocampo e células granulosas do cerebelo (MANENT et al., 2006). Uma exacerbação na concentração do neurotransmissor glutamato na fase embrionária pode acarretar em sérios danos na arquitetura da rede neural, não só causando danos imediatos, como também tornando o cérebro mais suscetível a transtornos tardios que tenham como gatilho fatores ambientais (KOH et al., 1999).

O papel do glutamato nos processos que desencadeiam na formação e manutenção da rede neural ao longo do desenvolvimento é crucial. No entanto as ações do glutamato durante o desenvolvimento não dependem somente da sua concentração na fenda sináptica, mas também das propriedades de seus receptores, que mesmo sendo

da mesma classe, podem apresentar diferentes atividades cinéticas ou afinidade pelos seus ligantes, isso devido à possibilidade de serem formados de forma homomérica ou heteromérica por um conjunto variado de subunidades (COX; KUCENAS; VOIGT, 2005; GIELEN et al., 2009; HABERNY et al., 2002; KUMAR; SCHUCK; MAYER, 2011; MOTT et al., 2010; SIMEONE; SANCHEZ; RHO, 2004). Os receptores ionotrópicos são compostos por tetrâmeros a partir de suas subunidades. As subunidades que irão compor esses tetrâmeros podem variar de acordo com a região do cérebro ou a fase de desenvolvimento (GIELEN et al., 2009). Em experimento realizado por Ritter e colaboradores (RITTER; VAZQUEZ; MEADOR-WOODRUFF, 2002), utilizando fatias do hipocampo de ratos, foi examinado os transcritos para as subunidades dos receptores NMDA, AMPA e cáinico por hibridização *in situ*, em várias fases do desenvolvimento entre 1 e 35 dias pós-nascimento (DPN). Verificou-se que quase todas as subunidades apresentaram um período de transição em que houve um maior pico de expressão entre 3 e 14DPN, períodos de maior plasticidade neural. Os níveis de expressão de cada subunidade ao longo do desenvolvimento têm sido vinculados a um amadurecimento dos receptores glutamatérgicos, já que esses níveis têm impacto sobre a composição dos receptores e conseqüentemente em suas propriedades farmacocinéticas (MONAGHAN; LARSEN, 1997; NANSEN et al., 2000; PESIĆ et al., 2010).

Os receptores cáinicos apresentam diferentes propriedades farmacocinéticas conforme as subunidades que os compõem, por isso a variação no nível de expressão dessas subunidades ao longo do desenvolvimento pode afetar suas respostas a fármacos (SWANSON et al., 2002). Os receptores cáinicos podem ser composto por homodímeros ou heterodímeros. Nos receptores cáinicos, as subunidades mais expressas na fase neonatal, de forma geral, são KA2 e GluR7, exceto na região do hipocampo onde há alta expressão da subunidade KA1 nos primeiros dias pós-nascimento (HOLOPAINEN, 2008; RITTER; UNIS; MEADOR-WOODRUFF, 2001; ZAMANILLO et al., 1999). A subunidade GluR5 não é detectada na fase embrionária no mesencéfalo e estriado, tendo seu maior pico de expressão nessas regiões durante a segunda semana pós nascimento, ao contrário da subunidade GluR6 que nessas regiões está presente desde a fase embrionária, e sofrendo um leve decréscimo nas fases subseqüentes. No hipocampo, GluR5 e GluR6 aparecem com similar distribuição, ao longo do desenvolvimento (LILLIU et al., 2002; RITTER; VAZQUEZ; MEADOR-

WOODRUFF, 2002; WILDING; HUETTNER, 2001; WULLNER et al., 1997). A expressão da subunidade GluR7 é detectada desde a fase embrionária, alcançando seu maior pico na primeira semana pós-nascimento, seguida de decréscimo até a fase adulta, quando é amplamente distribuída em todo o cérebro, porém com baixos níveis de expressão (LILLIU et al., 2002; SIMEONE; SANCHEZ; RHO, 2004). A subunidade KA1 aparece com baixos níveis de expressão desde a fase embrionária, com um pequeno aumento na segunda semana pós-nascimento, e mantendo-se com baixos níveis até a fase adulta, com presença principalmente na região do hipocampo. Ao contrário da subunidade KA1, a subunidade KA2, tem seus níveis de expressão aumentados desde a fase embrionária e se mantém com poucas variações até a fase adulta, apresentando ampla distribuição em todo o cérebro (LILLIU et al., 2002; RITTER; VAZQUEZ; MEADOR-WOODRUFF, 2002; SIMEONE; SANCHEZ; RHO, 2004; WILDING; HUETTNER, 2001; WULLNER et al., 1997)

Com relação aos receptores NMDA, sabe-se que as subunidades NR1 apresentam alto nível de expressão desde fases iniciais do desenvolvimento, por ser a única subunidade capaz de formar homodímeros, enquanto NR2 e NR3, só podem formar dímeros na presença de NR1, sendo assim a ausência da subunidade NR1 é letal (FORREST et al., 1994; SCHÜLER et al., 2008). As subunidades NR2 e NR3 apresentam-se com maior variabilidade, com NR2B e NR2D exibindo alta expressão no início do desenvolvimento, tanto em ratos quanto em humanos, sofrendo um decréscimo nas fases subsequentes, seguido de um aumento da expressão das outras subunidades (RITTER; UNIS; MEADOR-WOODRUFF, 2001; RITTER; VAZQUEZ; MEADOR-WOODRUFF, 2002; SIMEONE; SANCHEZ; RHO, 2004). Esta variação na expressão das subunidades ao longo da idade, também pode ser observada de acordo com a região do cérebro (Figura 3), com algumas subunidades tendo predominância em algumas áreas, como no caso da subunidade NR2A que em fases iniciais tem um nível de expressão quase nulo, e aparece expressa em níveis elevados, predominantemente no prosencefalo, hipocampo e cerebelo em ratos adultos (AKAZAWA et al., 1994). A subunidade NR2B que na fase inicial do desenvolvimento possui altos níveis de expressão e é amplamente distribuído no sistema nervoso, em fases subsequentes, tem seus níveis reduzidos e sua distribuição mais restrita ao córtex, hipocampo e bulbo olfatório (MONYER et al., 1994). A subunidade NR2C, que aparece apenas em fases mais tardias do desenvolvimento têm sua distribuição predominantemente na região do

cerebelo (SIMEONE; SANCHEZ; RHO, 2004). A subunidade NR2D, que em neonatos é amplamente distribuído, em adultos, apresenta uma queda em seus níveis de expressão e sua distribuição se restringe ao núcleo talâmico e hipotálamo, córtex, hipocampo e núcleo cerebelar (AKAZAWA et al., 1994; MONYER et al., 1994; SIMEONE; SANCHEZ; RHO, 2004). A subunidade NR3A está restrita a fases iniciais de desenvolvimento e a subunidade NR3B tem seus níveis aumentados ao longo do desenvolvimento em neurônios motores (GIELEN et al., 2009).

Figura 3 - Distribuição das subunidades NMDA em cérebro de camundongo



Fonte: (GIELEN et al., 2009)

Nota: Padrão de desenvolvimento da expressão das subunidades do receptor NMDA no cérebro de camundongo nos estágios pós-nascimento (0 dias pós-nascimento (P0), 2 semanas pós-nascimento (P14) e Adulto).

1.3 Patologias associadas a distúrbios na sinalização glutamatérgica

O papel excitatório do glutamato no sistema nervoso, quando em excesso, pode ser danoso, causando processos patológicos pelos quais as células nervosas sofrem injúrias, o que pode levar a apoptose. Esta estimulação excessiva causa um elevado influxo de cálcio na célula através de canais ionotrópicos ativando uma série de enzimas entre as quais, Fosfolipases, Endonucleases e Proteases de forma exacerbada, ativando ou inibindo a fosforilação da Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB) (MALI; ZHANG; CHINTALA, 2011; MANEV et al., 1990). Essa

neurotoxicidade causada por excesso de glutamato pode estar envolvida em uma série de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, entre outras (BLANDINI; PORTER; GREENAMYRE, 1996; GORDON, 2010; HYND; SCOTT; DODD, 2004; KONRADI; HECKERS, 2003). Algumas dessas doenças estão associadas à perda neuronal ao longo do envelhecimento, o que não é compatível com a velocidade em que acontece excitotoxicidade provocada pelo influxo de cálcio via receptores glutamatérgicos (IKONOMIDOU; TURSKI, 1995). No entanto, evidências sugerem que a ativação dos receptores glutamatérgicos pode estar associada a um prejuízo no metabolismo energético, além de estresse oxidativo, que culminariam em morte celular (COYLE; PUTTFARCKEN, 1993; IKONOMIDOU; TURSKI, 1995, 1996; TURSKI; TURSKI, 1993). Além disto, Estudos sobre distúrbios do humor e ansiedade têm demonstrado, que há alterações nos níveis de glutamato e no seu metabolismo, além de mudanças volumétricas nas áreas cerebrais onde há predominância de neurônios glutamatérgicos (MUSAZZI et al., 2013). Disfunções no sistema glutamatérgico também estão envolvidas na epilepsia, a qual é caracterizada pela ocorrência de crises convulsivas espontâneas, provocadas por descargas neuronais sincronizadas (NITECKA et al., 1984).

Diferente de algumas doenças neuropsiquiátricas, a esquizofrenia ainda tem suas bases pouco conhecidas. Entretanto, recentes avanços na identificação de genes suscetíveis indicam que esta doença possui impactos diretos na biologia molecular das sinapses. A influência genética na biologia das sinapses inclui efeitos em receptores (genes *GRM3*, *CHRNA7* e *G72*), transdução de sinal (gene *RGS4*) e regulação da plasticidade e sinaptogênese (genes *NRG1*, *disbindina*, *DISC1* e *calcineurina*), em especial nas sinapses glutamatérgicas (HARRISON; WEINBERGER, 2005).

A sinalização mediada pelos receptores NMDA parece ser influenciada direta ou indiretamente pela maioria dos genes identificados por conferirem suscetibilidade à patologia da esquizofrenia (HARRISON; WEINBERGER, 2005).

As disfunções neuroquímicas com base na sinalização glutamatérgica compõe uma vasta gama de patologias com consequências fisiológicas que impactam a saúde física dos indivíduos afetados e seus aspectos mentais incluindo a qualidade da interação social, o pensamento, os sentimentos e o humor. A definição do ponto inicial ou dos múltiplos fatores para o surgimento de tais patologias é extremamente difícil de

ser realizado. Para uma composição mais acurada destas disfunções faz-se necessário a conciliação de diversas estratégias de pesquisa incluindo genética molecular, estudos farmacológicos *in vitro* e *in vivo*, bem como dos fatores ambientais que possam contribuir. A contribuição dos modelos animais para o estudo das bases neuroquímicas de patologias é de fundamental importância. Desta forma, nos próximos itens serão apresentados modelos animais que contribuem para o estudo do sistema glutamatérgico.

1.4 Modelos animais baseados na ação do antagonista de receptor NMDA: MK-801

O uso MK-801 como modelo farmacológico promove efeitos como, ataxia, isolamento social, hiperatividade entre outros, o que o torna atrativo para a mimetização dos sintomas positivos e negativos ao modelar a patologia da esquizofrenia (BAST et al., 2000; HARGREAVES; CAIN, 1992; HYND; SCOTT; DODD, 2004; MANAHAN-VAUGHAN et al., 2008; RUNG et al., 2005). O antagonismo exercido pelo MK-801 ao receptor NMDA ainda pode desencadear outras consequências como déficits de aprendizado e memória (FLINT; NOBLE; ULMEN, 2013; VAN DER STAAY et al., 2011). Os efeitos comportamentais provocados pela administração do MK-801 são mensurados por uma série de testes. Entre os testes mais utilizados estão o labirinto em cruz elevado (*elevated Plus-maze*) (HLINÁK; KREJČÍ, 2002; PELLOW et al., 1985), o labirinto de Morris (*Morris Water-maze*) (AHLANDER et al., 1999; MORRIS, 1984) e o Campo aberto (*open-field*) (CAREY; DAI; GUI, 1998; HALL; L, 1932). A caracterização das manifestações comportamentais exibidas por modelos animais expostos ao MK-801 demonstra a existência de variações na intensidade da resposta, dependente de idade, sexo e linhagem do modelo proposto (ANDINÉ et al., 1999; FARLEY et al., 2012).

O efeito hiperlocomotor induzido pela administração de MK-801 parece estar fortemente associado à modulação exercida pela adenosina. Agonistas de receptores A₁ e A₂ neutralizam as alterações neurofisiológicas e comportamentais induzidas por antagonistas NMDA (FRASER et al., 1997). Foi demonstrado que o tratamento crônico com cafeína é capaz de atenuar o efeito hiperlocomotor provocado pelo tratamento

agudo com MK-801, evento denominado de tolerância cruzada (DALL'IGNA et al., 2003). Quando a administração da cafeína é efetuada na fase gestacional e neonatal, a tolerância cruzada exibida entre cafeína e MK-801 parece perdurar por algum tempo mesmo após o tratamento com cafeína ser interrompido (DA SILVA et al., 2005). Por outro lado, Zamzow e colaboradores demonstraram em seu trabalho a importância do Ca^{2+} no controle que o sistema glutamatérgico exerce sobre a liberação de adenosina na fenda sináptica (ZAMZOW; BOSE; PARKINSON, 2009). Além disto, alguns antagonistas de NMDA, como o MK-801, podem bloquear a liberação de adenosina dependendo da seletividade para as subunidades formadoras do receptor NMDA (ZAMZOW; BOSE; PARKINSON, 2009). Tudo isso sugere um grande envolvimento da adenosina nas alterações comportamentais e locomotoras promovidas pela administração de antagonistas glutamatérgicos.

Modelos que mimetizam sintomas relativos às disfunções no sistema glutamatérgico já foram desenvolvidos em ratos, primatas não humanos e nos últimos anos o uso de peixe-zebra tem crescido devido a uma série de fatores que o tornam um modelo animal muito atrativo. O uso do peixe-zebra para experimentos em neurociência tem se consolidado em virtude do seu repertório comportamental e sua conservada resposta a fármacos, o que permite traçar, de certa forma, um paralelo com outros vertebrados (BUSKE; GERLAI, 2011; CHAMPAGNE et al., 2010). Recentemente, o genoma do peixe-zebra foi sequenciado e foi identificado que 71% dos genes humanos têm ao menos um ortólogo em peixe-zebra (HOWE et al., 2013).

Assim como em mamíferos, o peixe-zebra apresenta variabilidade no estágio de desenvolvimento e na distribuição das subunidades que compõem o receptor NMDA (COX; KUCENAS; VOIGT, 2005). Testes envolvendo a administração do MK-801, demonstraram alterações no padrão de nado e comportamento do peixe-zebra, tanto em peixe adultos quanto em larvas (CHEN et al., 2010; SISON; GERLAI, 2010). A exposição do peixe-zebra adulto a antagonistas ou agonistas glutamatérgicos gera influência sobre sua atividade locomotora, levando tanto a um aumento da distância percorrida quanto a um padrão circular no trajeto percorrido (RIEHL et al., 2011; SEIBT et al., 2010; SWAIN; SIGSTAD; SCALZO, 2004). O comportamento de grupo, natural no peixe-zebra, também é alterado pela administração do MK-801, levando a uma diminuição na interação social (SEIBT et al., 2011; SISON; GERLAI, 2010), bem como, já foi registrado um decréscimo na preferência por ambientes enriquecidos após a

exposição ao MK-801 (SWAIN; SIGSTAD; SCALZO, 2004). Tais informações ainda são incipientes, mas contribuem para a consolidação do uso do peixe-zebra em estudos sobre os mecanismos da sinalização glutamatérgica envolvidos em doenças neurológicas.

1.5 Modelos animais baseados na ação do agonista de receptor Caínico: Ácido Caínico

A administração de ácido caínico representa um dos modelos de epilepsia mais amplamente utilizado nas fases iniciais do desenvolvimento, especialmente para mimetizar a epilepsia de lobo temporal (HOLOPAINEN, 2008; NITECKA et al., 1984). Foi demonstrado que roedores submetidos à indução de crises convulsivas por ácido caínico nas fases iniciais de desenvolvimento, quando na fase adulta, passaram a apresentar episódios convulsivos espontâneos (ZHANG et al., 2004). Evidências têm suportado a idéia de que o ácido caínico leva a neurotoxicidade através da ativação de receptores caínicos pré-sinápticos e a liberação de glutamato (ANDRADE-TALAVERA et al., 2013; RODRÍGUEZ-MORENO; SIHRA, 2004). Crises convulsivas ocorrem em decorrência de uma atividade neural sincrônica excessiva, podendo ser desencadeada por uma série de fatores, os quais podem ser mimetizados pela administração do agonista do receptor caínico/AMPA. A magnitude das crises convulsivas em animais modelos geralmente são medidas pela perda neuronal ou por escores comportamentais, que se sucedem progressivamente conforme a intensidade da crise (imobilidade, rigidez, movimentos circulares, clonus dos membros anteriores, quedas e Tônico-clonus (saltos) (MCKHANN et al., 2003). No entanto foi observado que a sensibilidade crises convulsivas e toxicidade provocadas pelo ácido caínico pode diferir entre as linhagens utilizadas. Por um longo tempo, roedores vem sendo usados como modelos de epilepsia, no entanto, em estudos recentes, o peixe-zebra têm tido sucesso tanto em larvas quanto em adultos como modelos para crises convulsivas, o que permite uma correlação da atividade cerebral usando modelos animais de epilepsia (ALFARO; RIPOLL-GÓMEZ; BURGOS, 2011). O cérebro de animais que sofreram crises convulsivas pode passar por subseqüentes processos, tais como, morte neuronal resposta neuroprotetora mediada e finalmente por um processo de mudanças na conectividade celular, reorganização sináptica e neurogênese (BENGZON et al., 1997; HOLOPAINEN, 2008; KOKAIA, 2011; SADGROVE; CHAD; GRAY, 2005). No entanto, diferente do padrão observado em animais adultos, animais mais jovens não apresentam redução na proliferação

neural, isso tanto para roedores quanto para peixe-zebra, dando indicativos que animais com a rede neural ainda imatura apresentam maior resistência aos danos provocados por ácido cáínico (HAAS et al., 2001; NITECKA et al., 1984; SADGROVE; CHAD; GRAY, 2005; TANDON et al., 1999).

1.5 Justificativa

O sistema glutamatérgico está envolvido em um conjunto de processos que são cruciais na fase inicial do desenvolvimento do sistema nervoso (MANENT et al., 2006). Distúrbios ocorridos nessa fase perturbam uma série de passos altamente regulados, podendo acarretar em uma reorganização da rede neural, culminando em uma série de consequências futuras (HOLOPAINEN, 2008; KOH et al., 1999; PARENT et al., 1997). Embora modelos animais não possam simular todos os sintomas de transtornos do sistema nervoso central, o uso de modelos que possam responder de forma contundente aos estímulos propostos, representa um grande ganho na investigação dos mecanismos envolvidos na ocorrência de diversas patologias.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a resposta locomotora e comportamental a agonistas e antagonistas de receptores glutamatergicos ao longo do desenvolvimento do peixe-zebra (*Danio rerio*), correlacionado com a expressão cerebral de subunidades de receptores NMDA e com estágios de convulsão.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a relação idade/dose-resposta ao MK-801 sobre o perfil locomotor do peixe-zebra em diferentes fases do desenvolvimento.
- Avaliar o efeito do tratamento prévio com cafeína sobre o perfil locomotor induzido por MK-801 em peixes-zebra.
- Avaliar a relação idade/dose-resposta ao MK-801 sobre o tempo no topo do aquário, como medida de comportamento ansioso em peixe-zebra em diferentes fases do desenvolvimento.
- Avaliar a relação dose-resposta ao ácido caínico sobre o perfil locomotor do peixe-zebra em diferentes fases do desenvolvimento.
- Avaliar o efeito do tratamento prévio com ácido caínico em fases iniciais do desenvolvimento do peixe-zebra sobre a indução de convulsão em animais adultos

Parte II

3 Resultados

- 3.1 Artigo Científico: Evaluation of age-dependent response to NMDA receptor antagonism in zebrafish.** Menezes FP, Kist LW, Bogo MR, Bonan CD e Da Silva R. Artigo a ser submetido ao periódico **Zebrafish** - Mary Ann Liebert, Inc.

Title Page

Title: Evaluation of age-dependent response to NMDA receptor antagonism in zebrafish

Authors full names:

Fabiano Peres Menezes¹, Luiza Wilges Kist², Maurício Reis Bogo², Carla Denise Bonan^{1,3},
Rosane Souza Da Silva^{1,3}.

Institutional Affiliations:

¹ Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

Key words: development; glutamate; NMDA receptor; zebrafish

*Contact details of the corresponding author

Postal Address: Faculdade de Biociências, PUCRS,

Avenida Ipiranga, 6681,90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone/ Fax: + 55 51 3320 3500/ Ext. 4158/+ 55 51 3320 3612

E-mail: rosane.silva@pucrs.br

ABSTRACT

Imbalances in glutamatergic signaling have been proposed as the cause of a number of neurological disturbances. The use of MK-801, an NMDA receptor antagonist, to mimic features of these neurological disturbances is shown effective both in mammals and in fish. However, the variability of the subunit comprising the NMDA receptor during development alters the pharmacokinetic properties of the receptor and leads to different answers to this drug. Here, we checked the developmental locomotors response of zebrafish to MK-801 (1, 5 and 20 μ M) and the challenge by caffeine exposure. Also the NMDA receptor subunits gene expression was analyzed through the development (7 to 120-day-post-fertilization (dpf)). Zebrafish displayed an age-dependent response to MK-801 with a peak response at 60 and 120 dpf. The magnitude of hyperlocomotion promoted by MK-801 and the cross-tolerance with caffeine was much less powerful for zebrafish than for rodents. The verification of expression levels in zebrafish NMDA receptors subunits shows that NR1 is expressed more steadily throughout development, while the NR2 subunits vary in accordance to the stage of development. The developmental locomotors response to MK-801 could be a consequence of differential expression of NMDA receptor, especially NR2C subunits, while NR2A and NR2B appear to be also important. This result of developmental response to MK-801 is a crucial component in the consolidation of zebrafish as a suitable model to study glutamatergic neurotransmission in early phases.

1. Introduction

As the main excitatory neurotransmitter, glutamate is strongly related to process such as development of normal synaptic connections, learning and memory (Aronica et al., 2011; Herlenius and Lagercrantz, 2004; Peng et al., 2011; Szapiro et al., 2003). Changes in glutamatergic transmission are proposed as possible causes of a series of psychiatric disorders, such as schizophrenia (Seillier and Giuffrida, 2009). Some symptoms of psychiatric disorders can be mimicked by use of glutamatergic agonists or antagonists in animal models. The classical use of MK-801, a non-competitive NMDA receptor antagonist (Dizolcipine maleate), can exacerbated hyperlocomotion as the main feature in rodents (Andiné et al., 1999).

Glutamatergic neurotransmission is implicated in a number of important neural processes during initial phase of development, participating in the formation of the neural network, assisting in neuronal migration, proliferation and control of neuronal survival and in subsequent processes of life-span (Ikonomidou et al., 1999). The direct or indirect interventions on normal glutamatergic neurotransmission in early stages of development can reflect on the behavior in adulthood (Zhang et al., 2004). Also, the treatment of rodents with adenosine blockers, like caffeine, during early embryonic and neonatal/juvenile life alters the classical locomotors response to MK-801, evidencing the liability of this system and the consequences of indirect interventions (Da Silva et al., 2005; Dall'igna et al., 2003).

In mammals, responses to drugs that act on the NMDA receptors can vary depending on the stage of development (Bandarchi et al., 1994; Kaindl and Ikonomidou, 2007; Zhu and Barr, 2001). These differences can be explained by the variation in the expression of the subunits of the NMDA receptors, which seems to follow a sequential pattern of increase and decrease according to the stage of development in mammalian models (Colwell et al., 1998; Watanabe et al., 1992). The study of the temporal pattern of expression of NMDA receptors in early development in mammals, exhibits some limitations due to the intrauterine embryonic development.

Zebrafish (*Danio rerio*) displays external fertilization and development, which facilitates the observation of early stages through a transparent egg. Several features of glutamatergic system were already characterized in zebrafish, such as the presence of excitatory aminoacids transporters and receptors, underlining the use of this animal as a suitable model to study

glutamatergic neurotransmission, especially in early stages of development (Cox et al., 2005; Rico et al., 2010). Like mammals, zebrafish presents variability in the expression of the NMDA receptor subunit during the development (Cox et al., 2005; Erreger et al., 2007; Luján et al., 2005; Manent et al., 2005). In previous studies, a series of behavioral changes in adult zebrafish were observed when exposed to MK-801, such as circular swimming hyperlocomotion, erratic movement and cognitive deficits (Blank et al., 2009; Seibt et al., 2010; Sison and Gerlai, 2010; Swain et al., 2004). However, poor information is available about the response to MK-801 in early development of zebrafish. Moreover, the relation between the expression pattern of the NMDA receptor subunits in early stages of development and their influence on developmental response to MK-801 is a crucial component in the consolidation of zebrafish as a suitable model to study glutamatergic neurotransmission in early phases.

2. Material and Methods

2.1 Animals and housing

The animals used are from the sixth generation of our breeding stock held at the Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil. The animals were kept on a shelf for automated tanks ZEBTEC, (Tecniplast Group Buguggiate (VA) Italy) in a ratio of 5 animals/L. All protocols followed Brazilian legislation and were approved by the Institutional Animal Care Committee (12/00319–CEUA PUCRS).

2.2 Exposure to MK-801

The animals (30-60-120-day-post-fertilization (dpf) and 2-year-post-fertilization (ypf)) were individually exposed by 30 minutes before tests to 300 ml of MK-801 solution (1, 5 or 20 μ M; Sigma Aldrich, USA) diluted in reconstituted water (water from osmose reverse plus marine salt 0.4ppt) in aquariums of 12x 12 x 7cm (W x H x D) (Seibt et al., 2010). Control animals undergo the same protocol in free-drug reconstituted water.

After exposure to MK-801 or reconstituted water, the animals were taken immediately to the test apparatus.

2.3 Exposure to caffeine

In order to check if MK-801 response in zebrafish is also affected by adenosine blockers, animals were housed during 14 days, before reaching 120 dpf, in solution caffeine at 100 μ M diluted in water system and renewed each three days or reconstituted water (Capiotti et al.,

2011). At 120dpf the animals was exposed by immersion in aquariums of 12x 12 x 7cm (W x H x D) containing 300ml of the solution MK-801 5 μ M diluted in reconstituted water or free-drug water. After exposure to MK-801 or reconstituted water, the animals was lead immediately for the test apparatus.

2.4 Locomotor and behavior analyses

The locomotion and behavior tests were conducted in a vertical tank 20 x 20 x 7 cm (W x H x D), containing water system (free of drugs) at 27°C. The animals were tested individually, and their behaviors were recorded by a front camera during 330 seconds. The first 30 seconds were considered acclimation. After the test, the video was analyzed using ANY-Maze software (Stoelting Co., Wode Dale, IL, USA). The tank was virtually divided horizontally into three equal zones, and the following behavior patterns were measured: distance traveled and time spent in the upper zone (considered a parameter of anxiety).

2.5 Analysis of gene expression by semi-quantitative RT-PCR

The analysis of gene expression was carried out by a semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) assay using 4 sets of pooled brains (60, 20, 10, 5 and 5 brains from 7-15-30-60 and 120-dpf, respectively). Total RNA of whole brains (7, 15, 30, 60 and 120 dpf) were isolated with Trizol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in accordance to the manufacturer's instructions. The total RNA was quantified by spectrophotometry (A260/280 nm) and after treated with Deoxyribonuclease I (Invitrogen) to eliminate genomic DNA contamination in accordance to the manufacturer's instructions. The cDNA was synthesized with ImProm-II[™] Reverse Transcription System (Promega) from 1 μ g total RNA, following the manufacturer's instruction (n-4). After, cDNAs of each time point were pooled to minimize variations. PCR reactions were performed using 25 ng of the pooled cDNAs, 0.1 μ M of each reverse and forward primers (Table 1, (Tang et al., 2007)), 0.2 μ M dNTP, 1x PCR Buffer, 2 mM MgCl₂ and 0.25 U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) in a total volume of 20 μ L. The PCR cycling conditions were: an initial polymerase activation step for 1 min at 94 °C, 40 cycles of 30s at 94 °C for denaturation, 30s at 60 °C for annealing and 45s at 72 °C for elongation. Post-extension at 72 °C was performed for 10 min. For each set of PCR reactions, a negative control was included. PCR products were analyzed on 1% agarose gel, containing GelRed[®] (Biotium) and visualized under ultraviolet light. *β -actin* was used as a constitutive gene.

2.5 Statistical Analysis

Data were expressed as mean \pm standard error of mean. The data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Tukey's considering $p < 0.05$ as statistically different for locomotor and behavioural experiments.

3. Results

The registration of travelled distance after MK-801 exposure in animals of 30dpf up to 2ypf, revealed that 30-day-old zebrafish is insensitive to MK-801 in all doses tested (Fig1.A). In animals aged 60, 120dpf and 2ypf, MK-801 promote an increase in locomotor activity, as measured by distance traveled, especially in animals exposed to a dose of 5 μ M. In general, animals of 60,120 dpf and 2ypf showed an inverted U-shaped response as the drug concentration. (Fig1.BCD) [$F_{(3;41)}=6.321$, $p=0.0013$; $F_{(3;27)}=7,358$; $p=0.0009$; $F_{(3;20)}=3.328$, $p=0.0404$, respectively].

The magnitude of response to MK-801 appears to be lower than the classical hyperactivity in rodents. The dose 5 μ M promoted an increase of 27%, 41% and 34% in the travelled distance of 60 and 120 days-old animals and 2-year-old animals, respectively, in relation to control animal (Fig.1.BCD).

Time on upper zone was not altered by MK-801 when 30-day-old and 2-year-old animals were evaluated (Fig.2AD). The analyses of variance from the time on upper zone from 60-day-old animals after 5 and 20 μ M of MK-801 revealed that the animals spent 91,3% and 72,9%, respectively of the total test time respectively, while control spend just 13,62% of the test total time in the aquarium's upper portion. [$F_{(3; 35)}=18.33$, $p=0.0001$] (Fig.2B). For 120-day-old animals, the spent time on upper zone after exposure to 20 μ M of MK-801 was 35% of the total test time while control group stayed 4.82% of the total test time in the aquarium's upper portion [$F_{(3;27)}=4.510$, $p=0.01$] (Fig.2C).

The pre-treatment with caffeine (100 μ M) during 14-days did not altered the basal travelled distance, while reduced the hyperlocomotion induced by MK-801 at 5 μ M in 120-days old animals (Fig.3).

The pattern of expression of NMDA receptor subunit revealed the presence of transcripts for the NR1 subunit and its paralogue in all stages of development (Figure 4). NR2 subunits and its paralogues had a variation in the expression according to the phase of the

development (Figure 4). In 7dpf, no NR2 subunit transcripts were detected. At 15dpf, transcripts were observed for NR2B1 subunit. Transcripts from brain of 30 and 60-day-old zebrafish presented the same profile, expressing NR2A.2 and NR2B.1 and 2. In 120dpf zebrafish, all tested NR2 genes were expressed. The presence of transcripts for constitutive gene β -actin was observed in all ages (Figure 4).

Discussion

In this study we show that there is an age-dependent response to the NMDA antagonist MK-801 in zebrafish. One of the behavioral response to the administration of MK-801 is characterized by hyperlocomotion, that can be counteracted by adenosine blockers (Da Silva et al., 2005; Dall'igna et al., 2003). The locomotor responses induced by this NMDA receptor antagonist is recognized by compensation in neurotransmission, as it causes an increased release of glutamate, which will act on non-NMDA receptors (Liu and Moghaddam, 1995; Moghaddam et al., 1997). Previous works in rodents corroborate our results showing that there is an age-dependent response to MK-801, with a lower response in very young animals, a peak response at intermediate ages and a slight decline at older ages (Eckle et al., 2007; Jacobs et al., 2000; Uehara et al., 2009). We also presented an age-dependent anxiolytic response, characterized by the increase in time spent at the top of the aquarium, which is one of the striking features of the anxiolytic effect induced by acute administration of MK-801 (Jessa et al., 1996; Plaznik et al., 1994; Seibt et al., 2011).

Although chronic treatment with glutamatergic receptor antagonists reveal a sharp increase in the number and distribution of the NMDA receptor via the membrane translocation of protein, (Rao and Craig, 1997) in the short term it is not possible to discern any changes in the availability of the NMDA receptor in the synaptic cleft of hippocampal neurons (Carroll et al., 1999; Fong et al., 2002). The locomotor profile of response to MK-801 in zebrafish can be a consequence to differential NMDA receptors subunits through the ages. Here, we detected NR1 subunits in all ages tested, which is in agreement with the fact that its absence in neonatal phases is lethal (Cox et al., 2005; Forrest et al., 1994; Zhu and Barr, 2001). The NR2 subunits that comprise NMDA receptors could vary in accordance with neural structure or due to ontogenetic processes such as synaptic maturation and refinement of circuits. The channel blocking properties displayed by MK-801 depend on the NR2 subunit composition of the

NMDAR complex (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004; Dumas, 2005; Monaghan and Larsen, 1997; Ritter et al., 2001). In rodents, the NR2C subunits are present in later stages of development and has higher affinity than NR2A and NR2B. However displayed slower rates of block and unblock by MK-801 than NR2A and NR2B, these later with the largest presence in early stages of development (Gielen et al., 2009; Monaghan and Larsen, 1997). As in rodents, the presence of a transient expression of NR2 subunits was also observed in zebrafish (Table 2). The NR2C and NR2D subunits appeared to be strongly expressed just in 120-day-old animals, which is in agreement to the response to MK-801 at this age. This response to MK-801 could receive contribution from the other NR2 subunits via formation of di- or tri-heteromeric structures. However, in 60-day-old and 2-year-old animals, we also detected high locomotor activity that could be a response to NR2A and NR2B subunits expression. While we know that detection of transcripts does not necessarily mean synthesis of protein, the profile of gene expression shown here brings interesting information to the scenario of MK-801 response during the development. The peak response to MK-801 occurred at 60 and 120-day-old animals, but this increase in locomotor activity was less powerful than in rodents, which evidences the need to standardize the use of MK-801 in models using zebrafish (Da Silva et al., 2005; Dall'Igna et al., 2003).

The response to MK-801 can be affected by the interaction between glutamatergic system and the adenosine, which appears as one of the ways in which the glutamatergic system may indirectly influence the dynamics of other neurotransmitters, including dopamine. In this context, we highlight the impact of adenosine concentration on glutamatergic signaling, which could cause indirect impact on dopaminergic regions, due to the interactions of A_{2A} - D_2 and A_1 - D_1 receptors (Ferré et al., 2007; Karcz-Kubicha et al., 2003; Klyuch et al., 2012; Mandryk et al., 2005). The fact that chronic exposure to caffeine affects the hiperlocomotor response to MK-801, reinforces the idea of an indirect impact of the glutamatergic system via dopamine/adenosine interaction (Dall'Igna et al., 2003; Mandryk et al., 2005). Previous studies evidenced the diminished responsiveness of adenosine receptors when administration of caffeine is held in a chronic way due to a change in their levels of expression (Svenningsson et al., 1999), which may be one of the pathways by which is observed cross-tolerance between these neurotransmitter/neuromodulator systems.

Summarizing, zebrafish displays an age- dependent response to MK-801 with a peak response in 60 and 120 dpf. This response could be a consequence of full expression of NMDA receptor, especially NR2C subunits, while NR2A and NR2B appear to be also important. As in rodents, adenosine signaling appears to be important to MK-801 response. These results contributed to the picture of zebrafish locomotor/behavior responses to MK-801 and its use to the study of glutamatergic system during normal development and dysfunction, especially considering the difficulty to establish a parallel of age/brain development between fish and rodents.

Acknowledgments

This work was supported by DECIT/SCTIE-MS through Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (Proc. 10/0036-5, conv. n. 700545/2008 – PRONEX).

Disclosure Statement

No competing financial interests.

References

- Andiné, P., Widermark, N., Axelsson, R., Nyberg, G., Olofsson, U., Mårtensson, E., Sandberg, M., 1999. Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 290, 1393–408.
- Aronica, E., Iyer, A., Zurolo, E., Gorter, J. a, 2011. Ontogenetic modifications of neuronal excitability during brain maturation: Developmental changes of neurotransmitter receptors. *Epilepsia* 52 Suppl 8, 3–5.
- Bandarchi, J., Scherer, W.J., Udin, S.B., 1994. Acceleration by NMDA treatment of visually induced map reorganization in juvenile *Xenopus* after larval eye rotation. *Journal of neurobiology* 25, 451–460.
- Blank, M., Guerim, L.D., Cordeiro, R.F., Vianna, M.R.M., 2009. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiology of learning and memory* 92, 529–534.
- Capiotti, K.M., Menezes, F.P., Nazario, L.R., Pohlmann, J.B., de Oliveira, G.M.T., Fazenda, L., Bogó, M.R., Bonan, C.D., Da Silva, R.S., 2011. Early exposure to caffeine affects gene expression of adenosine receptors, DARPP-32 and BDNF without affecting sensibility and morphology of developing zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology and Teratology*.
- Carroll, R.C., Lissin, D. V, von Zastrow, M., Nicoll, R.A., Malenka, R.C., 1999. Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. *Nature neuroscience* 2, 454–460.
- Colwell, C.S., Cepeda, C., Crawford, C., Levine, M.S., 1998. Postnatal development of glutamate receptor-mediated responses in the neostriatum. *Developmental neuroscience* 20, 154–163.
- Cox, J. a, Kucenas, S., Voigt, M.M., 2005. Molecular characterization and embryonic expression of the family of N-methyl-D-aspartate receptor subunit genes in the zebrafish. *Developmental dynamics* : an official publication of the American Association of Anatomists 234, 756–66.
- Cull-Candy, S.G., Leszkiewicz, D.N., 2004. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Science's STKE* : signal transduction knowledge environment 2004, re16.
- Da Silva, R.S., Hoffman, A., De Souza, D.O., Lara, D.R., Bonan, C.D., 2005. Maternal caffeine intake impairs MK-801-induced hyperlocomotion in young rats. *European Journal of Pharmacology* 509, 155–159.
- Dall'Igna, O.P., Da Silva, A.L., Dietrich, M.O., Hoffmann, A., de Oliveira, R. V, Souza, D.O., Lara, D.R., 2003. Chronic treatment with caffeine blunts the hyperlocomotor but not cognitive effects of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 in mice. *Psychopharmacology* 166, 258–63.
- Dumas, T.C., 2005. Developmental regulation of cognitive abilities: modified composition of a molecular switch turns on associative learning. *Progress in neurobiology* 76, 189–211.

- Eckle, T., Krahn, T., Grenz, A., Köhler, D., Mittelbronn, M., Ledent, C., Jacobson, M.A., Osswald, H., Thompson, L.F., Unertl, K., Eltzhig, H.K., 2007. Cardioprotection by ecto-5'-nucleotidase (CD73) and A2B adenosine receptors. *Circulation* 115, 1581–1590.
- Erreger, K., Geballe, M.T., Kristensen, A., Chen, P.E., Hansen, K.B., Lee, C.J., Yuan, H., Le, P., Lyuboslavsky, P.N., Micale, N., Jørgensen, L., Clausen, R.P., Wyllie, D.J.A., Snyder, J.P., Traynelis, S.F., 2007. Subunit-specific agonist activity at NR2A-, NR2B-, NR2C-, and NR2D-containing N-methyl-D-aspartate glutamate receptors. *Molecular pharmacology* 72, 907–920.
- Ferré, S., Ciruela, F., Woods, A.S., Lluís, C., Franco, R., 2007. Functional relevance of neurotransmitter receptor heteromers in the central nervous system. *Trends in Neurosciences* 30, 440–6.
- Fong, D.K., Rao, A., Crump, F.T., Craig, A.M., 2002. Rapid synaptic remodeling by protein kinase C: reciprocal translocation of NMDA receptors and calcium/calmodulin-dependent kinase II. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 2153–2164.
- Forrest, D., Yuzaki, M., Soares, H.D., Ng, L., Luk, D.C., Sheng, M., Stewart, C.L., Morgan, J.I., Connor, J.A., Curran, T., 1994. Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron* 13, 325–338.
- Gielen, M., Siegler Retchless, B., Mony, L., Johnson, J.W., Paoletti, P., 2009. Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature* 459, 703–707.
- Herlenius, E., Lagercrantz, H., 2004. Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Experimental neurology* 190 Suppl , S8–S21.
- Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovská, V., Turski, L., Olney, J.W., 1999. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science (New York, N.Y.)* 283, 70–74.
- Jacobs, P.S., Taylor, B.M., Bardgett, M.E., 2000. Maturation of locomotor and Fos responses to the NMDA antagonists, PCP and MK-801. *Brain research. Developmental brain research* 122, 91–95.
- Jessa, M., Nazar, M., Bidzinski, A., Plaznik, A., 1996. The effects of repeated administration of diazepam, MK-801 and CGP 37849 on rat behavior in two models of anxiety. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 6, 55–61.
- Kaindl, A.M., Ikonomidou, C., 2007. Glutamate antagonists are neurotoxins for the developing brain. *Neurotoxicity research* 11, 203–218.
- Karcz-Kubicha, M., Antoniou, K., Terasmaa, A., Quarta, D., Solinas, M., Justinova, Z., Pezzola, A., Reggio, R., Müller, C.E., Fuxe, K., Goldberg, S.R., Popoli, P., Ferré, S., 2003. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in the motor effects of caffeine after its acute and chronic administration. *Neuropsychopharmacology* 28, 1281–1291.

- Klyuch, B.P., Dale, N., Wall, M.J., 2012. Deletion of ecto-5'-nucleotidase (CD73) reveals direct action potential-dependent adenosine release. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 3842–7.
- Liu, J., Moghaddam, B., 1995. Regulation of glutamate efflux by excitatory amino acid receptors: evidence for tonic inhibitory and phasic excitatory regulation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 274, 1209–1215.
- Luján, R., Shigemoto, R., López-Bendito, G., 2005. Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience* 130, 567–580.
- Mandryk, M., Fidecka, S., Poleszak, E., Malec, D., 2005. Participation of adenosine system in the ketamine-induced motor activity in mice. *Pharmacological reports : PR* 57, 55–60.
- Manent, J.-B., Demarque, M., Jorquera, I., Pellegrino, C., Ben-Ari, Y., Aniksztejn, L., Represa, A., 2005. A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 4755–4765.
- Moghaddam, B., Adams, B., Verma, a, Daly, D., 1997. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17, 2921–7.
- Monaghan, D.T., Larsen, H., 1997. NR1 and NR2 subunit contributions to N-methyl-D-aspartate receptor channel blocker pharmacology. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 280, 614–620.
- Peng, S., Zhang, Y., Zhang, J., Wang, H., Ren, B., 2011. Glutamate receptors and signal transduction in learning and memory. *Molecular biology reports* 38, 453–460.
- Plaznik, A., Palejko, W., Nazar, M., Jessa, M., 1994. Effects of antagonists at the NMDA receptor complex in two models of anxiety. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 4, 503–512.
- Rao, A., Craig, A.M., 1997. Activity regulates the synaptic localization of the NMDA receptor in hippocampal neurons. *Neuron* 19, 801–812.
- Rico, E.P., de Oliveira, D.L., Rosemberg, D.B., Mussulini, B.H., Bonan, C.D., Dias, R.D., Wofchuk, S., Souza, D.O., Bogo, M.R., 2010. Expression and functional analysis of Na(+)-dependent glutamate transporters from zebrafish brain. *Brain research bulletin* 81, 517–523.
- Ritter, L.M., Unis, A.S., Meador-Woodruff, J.H., 2001. Ontogeny of ionotropic glutamate receptor expression in human fetal brain. *Brain research. Developmental brain research* 127, 123–133.
- Seibt, K.J., Oliveira, R.D.L., Zimmermann, F.F., Capiotti, K.M., Bogo, M.R., Ghisleni, G., Bonan, C.D., 2010. Antipsychotic drugs prevent the motor hyperactivity induced by psychotomimetic MK-801 in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural brain research* 214, 417–22.

- Seibt, K.J., Piato, A.L., da Luz Oliveira, R., Capiotti, K.M., Vianna, M.R., Bonan, C.D., 2011. Antipsychotic drugs reverse MK-801-induced cognitive and social interaction deficits in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural brain research* 224, 135–9.
- Seillier, A., Giuffrida, A., 2009. Evaluation of NMDA receptor models of schizophrenia: divergences in the behavioral effects of sub-chronic PCP and MK-801. *Behavioural brain research* 204, 410–5.
- Sison, M., Gerlai, R., 2010. Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*) in the plus maze. *Behavioural Brain Research* 207, 99–104.
- Svenningsson, P., Nomikos, G.G., Fredholm, B.B., 1999. The stimulatory action and the development of tolerance to caffeine is associated with alterations in gene expression in specific brain regions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 4011–4022.
- Swain, H. a, Sigstad, C., Scalzo, F.M., 2004. Effects of dizocilpine (MK-801) on circling behavior, swimming activity, and place preference in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology and teratology* 26, 725–9.
- Szapiro, G., Vianna, M.R.M., McGaugh, J.L., Medina, J.H., Izquierdo, I., 2003. The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK, and CAMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear. *Hippocampus* 13, 53–58.
- Tang, R., Dodd, A., Lai, D., McNabb, W.C., Love, D.R., 2007. Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 39, 384–390.
- Uehara, T., Sumiyoshi, T., Seo, T., Itoh, H., Matsuoka, T., Suzuki, M., Kurachi, M., 2009. Long-term effects of neonatal MK-801 treatment on prepulse inhibition in young adult rats. *Psychopharmacology* 206, 623–630.
- Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K., Mishina, M., 1992. Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* 3, 1138–1140.
- Zhang, G., Raol, Y.S.H., Hsu, F.-C., Brooks-Kayal, A.R., 2004. Long-term alterations in glutamate receptor and transporter expression following early-life seizures are associated with increased seizure susceptibility. *Journal of neurochemistry* 88, 91–101.
- Zhu, H., Barr, G.A., 2001. Inhibition of morphine withdrawal by the NMDA receptor antagonist MK-801 in rat is age-dependent. *Synapse (New York, N.Y.)* 40, 282–293.

Figure 1

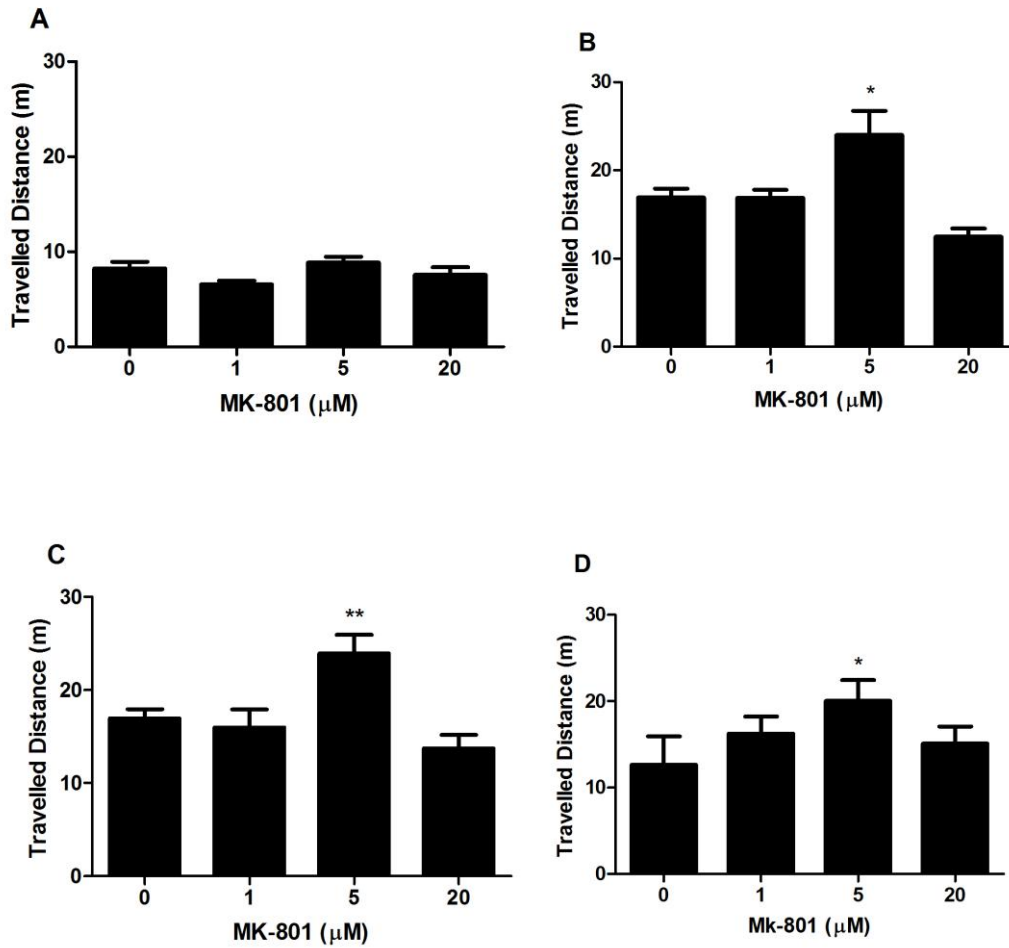


Figure 1. The effect of MK-801 on locomotor activity of zebrafish. A. 30 dpf, B. 60 dpf, C. 120 dpf e D. 2 ypf. Each bar represent the mean \pm S.E.M. of groups of at least 8 animals. *p < 0,05, **p < 0.01 vs water system. (One Way Anova).

Figure 2

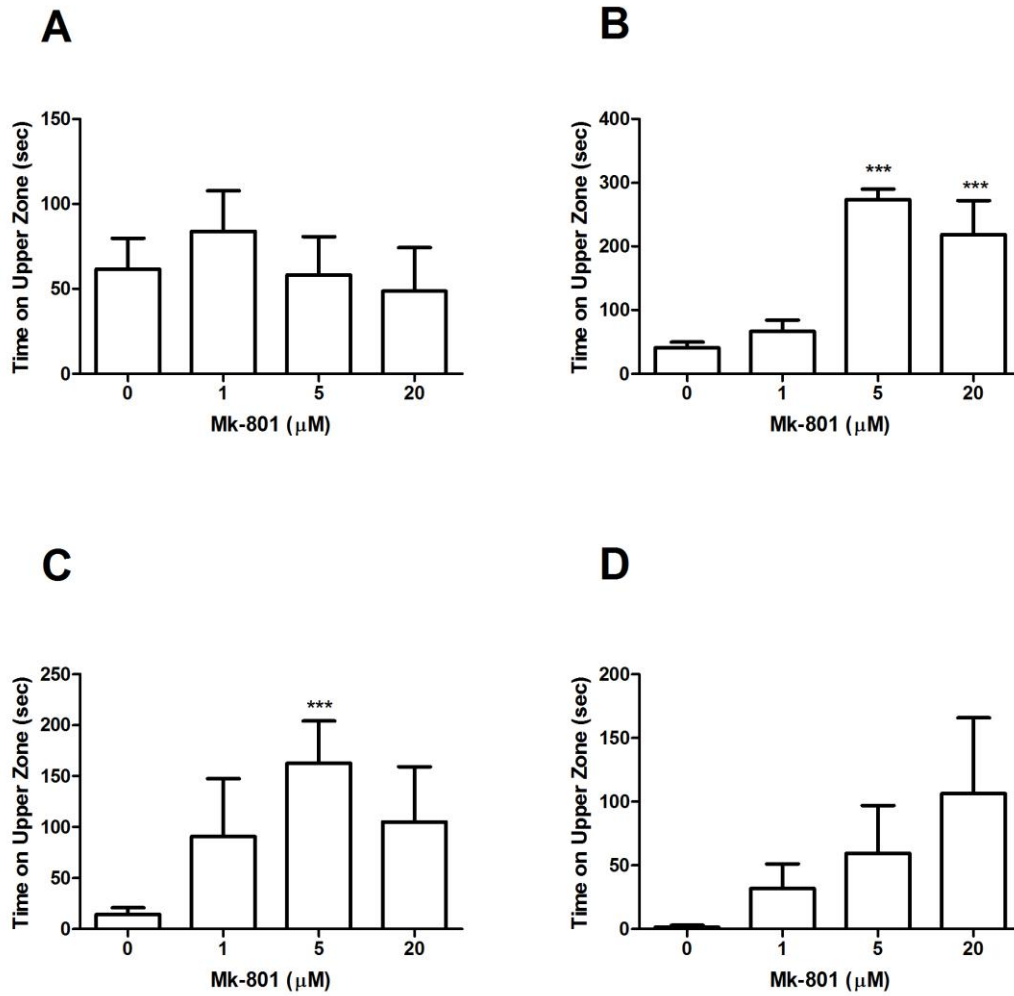


Figure 2. The effect of MK-801 on time on upper zone: A. 30dpf, B. 60dpf, C. 120dpf e D. 2ypf. Each bar represent the mean \pm S.E.M for groups of at least 8 animals. *** $p < 0.001$ vs water system. (One Way Anova).

Figure 3

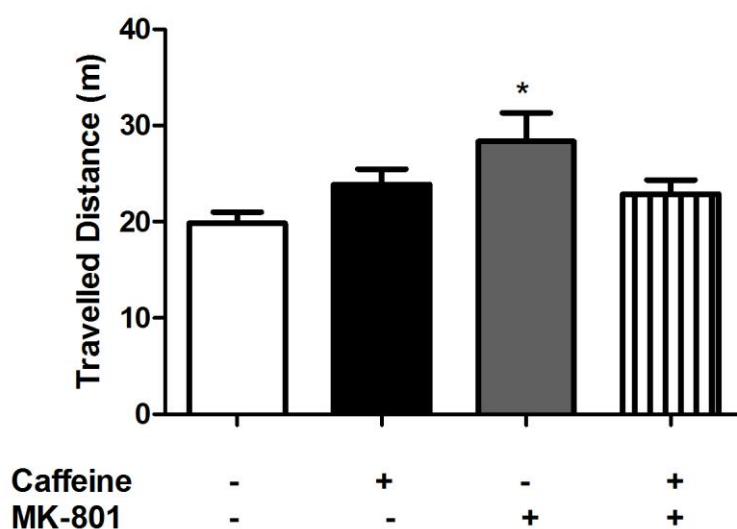


Figure 3. Influence of pre-treatment with Caffeine on the effects of MK-801 on locomotor activity: Animals with 120 dpf, Caffeine (100 μ M) attenuated the hyperlocomotion caused by exposure to MK-801 (5 μ M). Each bar represents the mean \pm S.E.M. for groups of at least 8 animals. * p <0.05 vs water system. (One Way Anova).

Table 1. Primer sequences for RT-PCR experiments

Sequence	Forward	Reverse
ZN1.1.RH*	5'-CCAGAAGCGGTACGAGCAGGTGTT-3'	5'-GCGGTGTAGGAGACCGGAGTGGGC-3'
ZN1.2.RH*	5'-TGCGCCTGGTTCTGTTTCGCCTTTC-3'	5'-TTCAGTATGCTCCTGACCTGAACA-3'
ZN2A.1.RH*	5'-TGGCGTCCATATCGATATGAAGAA-3'	5'-GGTCATTGCTTTCATGCGGACTGA-3'
ZN2A.2.RH*	5'-GTGTGGAACGGCATGGTGGGAGAG-3'	5'-CCAGAGGAAAGCGAGTGTGAGAGA-3'
ZN2B.1.RH*	5'-TCATCGAGACCGCGATCAGTGTGA-3'	5'-AAATCATTGGGATTCTGAAACTTC-3'
ZN2B.2.RH*	5'-AATCGCTGCTTGGCAGACGGACGA-3'	5'-GCTTTGCATCATGGATCATGGAAA-3'
ZN2C.1.RH*	5'-GGCTTCTACAAACGTGCAGATATG-3'	5'-CCTTCTTGCTACTAAGCCCAGACA-3'
ZN2C.2.RH*	5'-ACAGTCTCACCTTCTGCCTTCTG-3'	5'-AACAACCTTAAACCGTTAAAAGCTA-3'
ZN2D.1.RH*	5'-GAGCCGTACAGTCCAGCTGTGTGG-3'	5'-ACTCACCCGACTAAAAGCCAGTAA-3'
ZN2D.2.RH*	5'-CGAAGCCTACAGAGCGGCAAGAGT-3'	5'-TGAGTCCTGACACAGTGTGCGATGT-3'
β -actin**	5'-CGAGCTGTCTCCCATCCA-3'	5'-TCACCAACGTAGCTGTCTTTCTG-3'

* Cox et al.(2005)

** Tang et al. (2007)

Table 2. Comparative NMDA receptor subunits gene expression in different stages of development in rat and zebrafish

	Zebrafish*	Rat**
Larvae¹/Neonate	NR1-2B	NR1 - 2B - 2D
Young²/P14	NR1-2A-2B	NR1-2A-2B-2C-2D
Adult³/Adult	NR1-2A-2B-2C-2D	NR1-2A-2B-2C-2D

1: 7-15dpf; 2: 30-60dpf; 3: After 120dpf

* Figura 4

**Gielen et al. (2009)

3.2 Artigo Científico: Tolerance to seizure induced by kainic acid is produced in a specific period of zebrafish development. Menezes FP, Rico EP e Da Silva RS. Artigo aceito para publicação no periódico *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, Special Issue on Zebrafish Models*, 2014 Apr 15. pii: S0278-5846(14)00080-3. doi: 10.1016/j.pnpbp.2014.04.00.



Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pnp

Tolerance to seizure induced by kainic acid is produced in a specific period of zebrafish development

Fabiano Peres Menezes^a, Eduardo Pacheco Rico^{b,c}, Rosane Souza Da Silva^{a,d,*}^a Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil^b Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil^c Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Excitotoxicidade e Neuroproteção (INCT-EN), 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil^d Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-IM), 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Available online xxxxx

Keywords:

Development
Glutamatergic system
Kainic receptors
Zebrafish

ABSTRACT

During brain development, the electrical disturbance promoted by a seizure can have several consequences, because it can disturb a set of steps extremely regulated needed to the correct brain maturation. Animal modeling of seizure is invaluable to contribute to the mechanistic understanding of punctual seizure event, and those that triggered in an immature neural network could alter the mature brain physiology. In the present study we observed that the exposure to kainic acid diluted directly in water of zebrafish decreased the locomotor activity at 7 days post-fertilization (dpf) animals and increased at 15 dpf, despite the absence of more specific seizure features. Pre-exposure to kainic acid (500 μ M) diluted in water at 7 dpf animals reduced the susceptibility to a second exposure 2 months later by intraperitoneal injection. The current data suggest that these different responses are associated with neuronal maturation process and open a question about the window of development that are crucial to long lasting effects related to seizure in this animal model.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Epilepsy is a disorder characterized by recurrent seizures. The electrical disturbance during a seizure can have several consequences depending on the magnitude of the seizure and the brain region affected. Anti-epileptic drugs are available, but they often worsen other clinical factors (Mula and Sander, 2007; Frye et al., 2013). There is no consensus of optimal treatment strategy when neonates and children are considered (Slaughter et al., 2013) increasing the need of basic neurobiology studies especially during the early development.

The major developmental disorders giving rise to epilepsy are disorders of neuronal migration, including those that may favor the development of primary generalized or focal epilepsies at later stages in life (Koyama et al., 2012). The animal modeling of this pathogenesis is an invaluable way to contribute either to the mechanistic understanding or to the improvement of treatment alternatives. In animal models, seizures induced by administration of kainic acid (KA) lead to neuronal death due to neurotoxicity caused by excessive influx of Ca^{+2} resulted from increased excitatory synapses (Henshall, 2007; Zhang et al., 2011). It was observed that cell death induced by seizures in structures such as dentate gyrus is followed by particular process of neurogenesis

and reorganization of the neural network, both in adult animals and neonates (Kokaia, 2011; Parent et al., 1997). Unlike the mature brain, the immature postnatal brain appears to be more resistant to cell death after brain injury induced by convulsion and somehow reacts with seizures, reducing neuronal proliferation (Haas et al., 2001; Ribak and Navetta, 1994; Sadgrove et al., 2005).

As a reflex of the excitatory and inhibitory imbalance, the behavioral responses to pharmacology-induced seizure have long been contributing to the scenario of epilepsy in animal models, both rodents and fish (Baraban et al., 2005; Koh et al., 1999). In larvae of zebrafish, it has been reported that exposure to pentylentetrazole (PTZ) induces status epilepticus like seizure behavior activity accompanied by epileptiform discharges, expression of *c-fos* and reduced cell proliferation (Baraban et al., 2007; Kim et al., 2010). Kainic acid injected in adult zebrafish was followed by dose-dependent behavioral seizures while in larvae the observation of features of seizures is poorly characterized despite the registration of epileptiform discharges accompanied by cell proliferation decline (Alfaro et al., 2011; Kim et al., 2010).

The zebrafish brain can be divided in three regions, the forebrain, the midbrain, and the hindbrain. The zebrafish forebrain is composed by telencephalon and diencephalon, being the former the main responsible for high brain functions, especially those displayed by dopaminergic signaling (Salgado et al., 2012; Wilson and Houart, 2004). Electrodes to register the electrical activities of neurons through potential difference across the forebrain of zebrafish have been used in PTZ-induced seizure

* Corresponding author at: Faculdade de Biociências, PUCRS, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3320 3500x4158; fax: +55 51 3320 3612. E-mail address: rosane.silva@pucrs.br (R.S. Da Silva).

studies (Pineda et al., 2011). Epileptiform waves accompanied by loss of cells under kainic acid exposure have been detected especially in the telencephalic and diencephalic areas, and medial tectal proliferation zone in larval zebrafish (Kim et al., 2010).

The study of the mechanism underlining the origin and progress of seizure is still mandatory to contribute to the management of this disorder. In this way zebrafish has been proposed as a simple and useful vertebrate model for the induction of seizures allowing high-throughput drug screening. However, the use of zebrafish in the very beginning of the development to characterize the behavioral features of kainic acid exposure and the evaluation of the long lasting effects of early exposure to this pro-convulsant agent are still poorly studied. For this reason we aimed to characterize (I) the effect of different doses of kainic acid on the locomotor activity and seizure scores through the initial ages of zebrafish and (II) the effect of pre-exposition to kainic acid in the response to this pro-convulsant in later phase.

2. Material and methods

2.1. Animals and housing

The animals used are from the sixth generation of our breeding stock held at the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil. The animals were kept on a shelf for automated tanks ZEBTEC (Tecniplast Group Buguggiate (VA) Italy) in a ratio of 5 animals/L. Animals were kept on a day:night cycle of 14:10 h and fed three times daily with flaked fish food that was supplemented with live artemia. All protocols followed Brazilian legislation and were approved by the Institutional Animal Care Committee (12/00319—CEUA PUCRS).

2.2. Exposure to kainic acid

The animals were individually exposed to kainic acid (Sigma Aldrich, USA) in reconstituted water (water from osmose reverse plus marine salt) during 31 min by immersion in vertical aquariums size 5 × 5 × 2 cm (w × h × d) or 24-well culture plate. Controls were kept in free-drug reconstituted water. A dose–response curve of KA (100, 300 and 500 μM) was performed to each age analyzed (7, 15 and 30 day post-fertilization (dpf)).

2.3. Locomotor activity

The locomotor activity of animals exposed to KA was recorded by a front camera (15 and 30 dpf, n = 6) or top camera (7 dpf, n = 8) and after, it was analyzed by ANY-maze software (Stoelting Co., Wood Dale, USA). The distance traveled was recorded during 30 min of KA exposure, the first 1 min was considered acclimatization. The overall analysis was demonstrated as total distance traveled (m) during the 30 min or divided into 6 blocks of 5 min, to check for changes in the locomotor activity over time.

2.4. Pre-exposure to kainic acid

Animals aged 24 hour post-fertilization (hpf), 7 and 15 dpf (n = 9) were exposed to KA 500 μM diluted in water during 30 min, as described previously (item 2.1). After the exposure, animals were housed in control condition (drug-free) until reach 2 month post-fertilization (mpf). The later exposure to KA occurred at 2 mpf by intraperitoneal (i.p.) injection (6 mg/kg, injection volume of 10 μL) (Alfaro et al., 2011). All animals were previously anesthetized by immersion in 100 μg/mL of tricaine (MS-222). KA (Sigma Aldrich, USA) was diluted in phosphate-buffered saline (PBS) for treatment purposes.

2.5. Seizure scores

Throughout the period of pre-exposure to KA, the behavior of the larvae was monitored for possible manifestation of some of the convulsive stages characterized in previous works (Baraban et al., 2005). At the second exposure (2 months later) the following swimming behavior was classified as seizure score, using the scale: Stage I, immobility and hyperventilation of the animal; Stage II, whirlpool-like swimming behavior; Stage III, rapid movements from right to left; Stage IV, abnormal and spasmodic muscular contractions; Stage V, rapid whole-body clonus-like convulsions; Stage VI, sinking to the bottom of the tank and spasms for several minutes; and Stage VII, death (Alfaro et al., 2011; Baraban et al., 2005).

2.6. Statistics

Data are presented as means ± standard errors of the mean (SEM). The distance traveled across-time (blocks of 5 min) was analyzed by two-way analysis of variance and total distance traveled was analyzed by one-way analysis of variance followed by Bonferroni's post hoc. One-way analysis of variance was performed to assess the differences in seizure scores between groups followed by Newman–Keuls (Graphpad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). A *p*-value < 0.05 indicates statistical significance.

3. Results

The analysis of the total distance traveled by animals exposed to KA showed different responses in accordance with age (Fig. 1). Seven dpf animals exposed to KA exhibited lower locomotor activity when compared to control animals in all doses tested (Fig. 1B) [$F(3;34) = 10.62$, $p < 0.0001$]. The across-time analysis of 7 dpf animals shows that this reduction of distance traveled occurred most of the time of KA exposure with exception of block I (5 min) and block IV (20 min) (Fig. 1A). Analysis of locomotor activity from 15 dpf animals exposed to KA showed a significant increase at the dose of 500 μM during the first 4 blocks of analysis, when compared to the control group (Fig. 1C, D) [$F(3;31) = 7.108$, $p < 0.0009$]. Exposure to KA caused no significant effect on locomotion in 30 dpf animals in any of the tested doses (Fig. 1E, F) [$F(3;32) = 0.5115$, $p = 0.677$]. None of the animals exposed to KA in all doses tested exhibited events attributable to seizure considering the scores defined in previous investigations (Alfaro et al., 2011).

The 7 dpf animals pre-exposed to KA became less susceptible to a second exposure to KA at 2 mpf (Fig. 2). The behavioral changes from 7 dpf pre-exposed animals reached seizure score III over 30 min, which were lesser than animals that did not undergo prior exposure [$F(3;20) = 5.607$, $p < 0.001$]. Groups of 24 hpf and 15 dpf pre-exposed animals reached the highest seizure scores V/VI through the 30 min post-injection similarly to control animals (Fig. 2).

4. Discussion

The typical profile of body movements during a seizure is one of the most desired features in animal models, since it confirms the crisis in a simple way. Zebrafish has been used successfully to model the most common features of seizure through classic pro-convulsant, such as pentylenetetrazole and kainic acid (Alfaro et al., 2011; Baraban et al., 2007, 2005). The origin and consequences of first convulsive events, especially during brain development, are keystone to help the management of this pathology, although the modeling is difficult to design. Here, we defined two approaches to contribute to the modeling of seizure crisis in developing zebrafish. In the first approach, 7, 15 and 30 dpf larvae were exposed for 30 min to KA diluted in the water, while its locomotion and general behavior were recorded. On the basis of the available literature we could suggest that the kainate is able to reach their cellular target in zebrafish larvae on the doses used

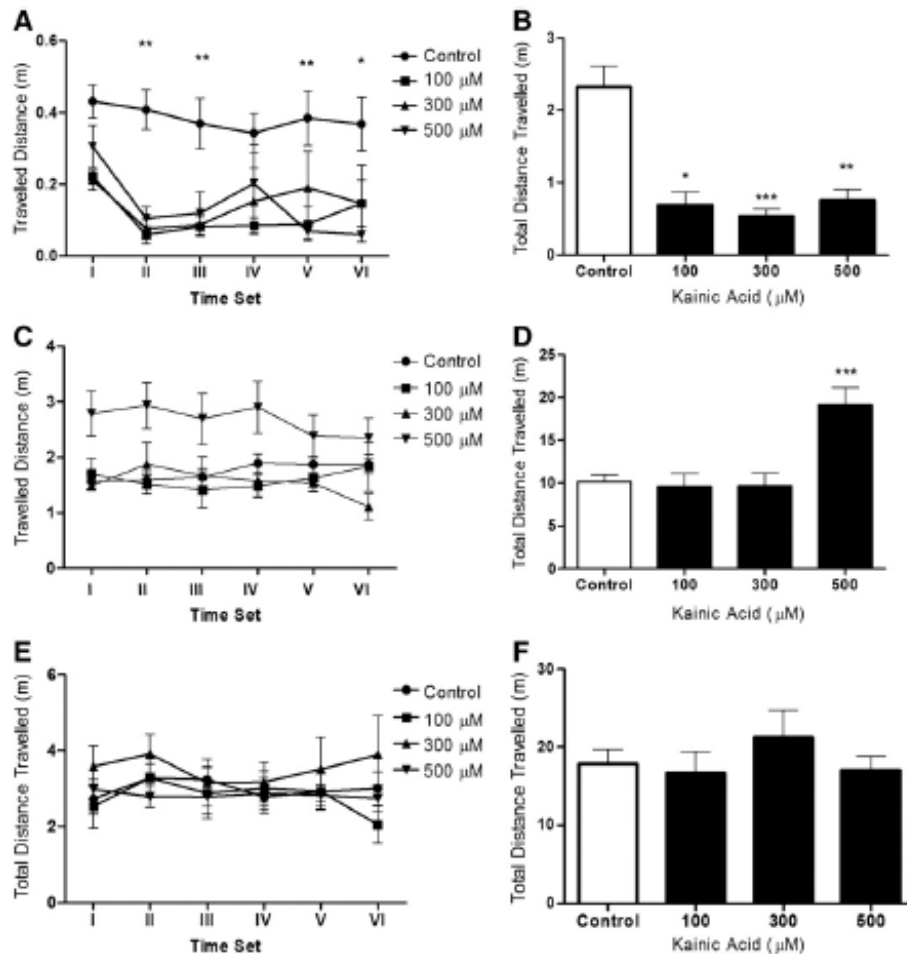


Fig. 1. Distance traveled (m) during 30 min of KA exposure (100, 300 and 500 μM) or control (drug-free) from 7 dpf (n = 8) (A, B), 15 dpf (n = 6) (C, D) and 30 dpf (n = 6) zebrafish (E, F). Figures A, C, E demonstrate the data as 6 blocks of 5 min each. Figures B, D, F demonstrate the total distance from 30 min. Data were expressed as mean ± S.E.M. of animals for each group and were analyzed by two-way ANOVA (blocks) and one-way ANOVA (total distance) followed by Bonferroni's post hoc test. *p < 0.05 denotes a significant difference from the control group.

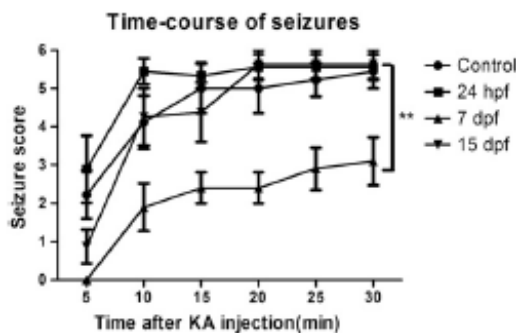


Fig. 2. Seizure levels after intraperitoneal KA injection (6 mg/kg) at 2 month post-fertilization zebrafish. Animals were pre-exposed to KA (500 μM) at 24 hour post-fertilization, 7 and 15 days post-fertilization. Controls were drug-free. The scores of seizure used were: Stage I, immobility and hyperventilation of the animal; Stage II, whirlpool-like swimming behavior; Stage III, rapid movements from right to left; Stage IV, abnormal and spasmodic muscular contractions; Stage V, rapid whole-body clonus-like convulsions; Stage VI, sinking to the bottom of the tank and spasms for several minutes; and Stage VII, death (Alfaro et al., 2011). The mean value of the seizure scores ± SEM (n = 9) for each group was plotted against time after KA injection. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Newman-Keuls post hoc test for comparison among the groups (**p < 0.001 for the comparison between curves).

here (Kim et al., 2010). Although the animals have not shown specific manifestations of previously documented *status epilepticus*, even though the concentration used was 10 times higher than those able to alter neuronal discharges (Kim et al., 2010), we observed intriguing differences in locomotor activity between the ages tested. Animals exposed to kainic acid at 7 dpf showed hypoactivity compared to the control group, leading us to imply that this age in zebrafish could correspond to the stage of development in rodents where glutamatergic hippocampal cells typically exhibit inhibitory neurotransmission mediated via GABA (Ambrogini et al., 2004; Gutiérrez, 2003; Ye et al., 2000). In this documented phase, presynaptic GABA release can be modulated by kainic receptors after KA administration (Ambrogini et al., 2004; Cossart et al., 2001; Fiszman et al., 2007; Gutiérrez, 2003; Lauri et al., 2006; Mathew et al., 2008; Ye et al., 2000) and could be the reason of the decreased locomotor activity of zebrafish larva at 7 dpf. On the other hand, 15 dpf zebrafish exhibited hyperlocomotor activity at the highest dose tested, without any other feature of seizure, and 30 dpf zebrafish had no effect on locomotor activity. These different responses could be correlated with the state of neuronal development, in which the level of response to the stimuli seems to follow the normal maturation of neurotransmitter systems (Ye et al., 2000). One possibility for this temporal difference could be linked to different levels of expression of the subunits that comprise glutamatergic receptors in the course of

Please cite this article as: Menezes FP, et al. Tolerance to seizure induced by kainic acid is produced in a specific period of zebrafish development, Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.04.004>

development (Lilliu et al., 2002; Ritter et al., 2002). Different arrangements in the composition of these receptors cause changes in their pharmacokinetics, thus generating different levels of response (Fisher and Mott, 2011; Mott et al., 2010).

As expected, animals exposed to KA by intraperitoneal injections at 2 months post-fertilization exhibited the characteristic profile of seizure fitting the defined scores published by Alfaro and co-workers (Alfaro et al., 2011). While one of the explanations to this strong response at this developmental phase of zebrafish could be the maturation of glutamatergic system, we should be aware of the more direct way of kainic acid delivery and dose. As a second approach we evaluated if an early exposure to KA, despite the weak locomotor response, is able to affect the adult response to KA. In this way we submitted embryos and larvae of zebrafish to KA and raised them until 2 mpf when they received an i.p. injection of KA. The KA pre-exposition was able to decrease the intensity of seizure score just on those animals pre-exposed to KA at 7 dpf. It has been observed that seizures can affect the level of expression of some receptors, and that the occurrence of seizure during critical stages of brain development may confer some resistance to subsequent seizures induced by drugs (Tandon et al., 2002). The overstimulation of stimulatory synapses generates an increase of inhibitory pathways in the immature brain by increasing the release of GABA, which is strongly related to proliferation, migration, differentiation, synapse maturation, and cell death (Avallone et al., 2006; Owens and Kriegstein, 2002a, 2002b; Sihra and Rodríguez-Moreno, 2011). In this way the resistance seen here could be associated to the fact that the age at which the animals were exposed corresponds to the most important period of neural refinement of zebrafish brain, which could result in a long lasting effect (Baraban et al., 2005; Di Marco et al., 2009; Fox and Wong, 2005; Wei et al., 2012).

5. Conclusion

In summary, zebrafish larvae despite the previous registered epileptiform discharges and reduced cell proliferation (Alfaro et al., 2011; Kim et al., 2010) after kainic acid exposure did not present classic behavior/locomotor activity related to seizure until 7 dpf, while at 15 dpf the increase of locomotor activity was registered but not accompanied by classic features of seizure. The exposure to kainic acid at 7 dpf was able to promote tolerance to the repeated exposure at juvenile/adult stage of development indicating that this former period can be crucial to the neural refinement and consequences to the occurrence of later convulsive events.

Disclosure statement

No competing financial interests. All authors approved the final version of this article. The individual contribution of authors was as follows: FPM and EPR designed and executed the experiments and produced the manuscript and RSS contributed to the rational of the research and in the production of the manuscript.

Acknowledgment

This work was supported by DECIT/SCTIE-MS through Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (Proc. 10/0036-5, conv. n. 700545/2008 – PRONEX).

References

- Alfaro JM, Ripoll-Gómez J, Burgos JS. Kainate administered to adult zebrafish causes seizures similar to those in rodent models. *Eur J Neurosci* 2011;33:1252–5.
 Ambrogini P, Laitaniz D, Ciuffoli S, Agostini D, Bertini L, Stocchi V, et al. Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. *Brain Res* 2004;1017:21–31.

- Avallone J, Gashi E, Magrys B, Friedman IK. Distinct regulation of metabotropic glutamate receptor (mGluR1 alpha) in the developing limbic system following multiple early-life seizures. *Exp Neurol* 2006;202:100–11.
 Baraban SC, Dinday MT, Castro PA, Chege S, Gajen S, Taylor MR. A large-scale mutagenesis screen to identify seizure-resistant zebrafish. *Epilepsia* 2009;50:1151–7.
 Baraban SC, Taylor MR, Castro PA, Baier H. Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience* 2005;131:759–68.
 Cossart R, Tyzio R, Dinocourt C, Esclapez M, Hirsch JC, Ben-Ari Y, et al. Presynaptic kainate receptors that enhance the release of GABA on CA1 hippocampal interneurons. *Neuron* 2001;29:497–508.
 Di Marco S, Nguyen VA, Bisti S, Protti DA. Permanent functional reorganization of retinal circuits induced by early long-term visual deprivation. *J Neurosci* 2009;29:13691–701.
 Fisher JL, Mott DD. Distinct functional roles of subunits within the heteromeric kainate receptor. *J Neurosci* 2011;31(47):17113–22.
 Fiszman ML, Erdélyi F, Szabó G, Vicini S. Presynaptic AMPA and kainate receptors increase the size of GABAergic terminals and enhance GABA release. *Neuropharmacology* 2007;52:163–70.
 Fox K, Wong ROL. A comparison of experience-dependent plasticity in the visual and somatosensory systems. *Neuron* 2005;48:465–77.
 Frye RE, Rosignol D, Casanova MF, Brown GL, Martin V, Edelson S, et al. A review of traditional and novel treatments for seizures in autism spectrum disorder: findings from a systematic review and expert panel. *Front Public Health* 2013;1:31.
 Gutiérrez R. The GABAergic phenotype of the “glutamatergic” granule cells of the dentate gyrus. *Prog Neurobiol* 2003;71:337–58.
 Haas KZ, Sperber EF, Opanashuk LA, Stanton PK, Moshé SL. Resistance of immature hippocampus to morphologic and physiologic alterations following status epilepticus or kindling. *Hippocampus* 2001;11:615–25.
 Henshall DC. Apoptosis signalling pathways in seizure-induced neuronal death and epilepsy. *Biochem Soc Trans* 2007;35:421–3.
 Kim Y-H, Lee Y, Lee K, Lee T, Kim Y-J, Lee C-J. Reduced neuronal proliferation by proconvulsant drugs in the developing zebrafish brain. *Neurotoxicol Teratol* 2010;32:551–7.
 Koh S, Storey TW, Santos IC, Mian AY, Cole AJ. Early-life seizures in rats increase susceptibility to seizure-induced brain injury in adulthood. *Neurology* 1999;53:915–21.
 Kokaia M. Seizure-induced neurogenesis in the adult brain. *Eur J Neurosci* 2011;33:1133–8.
 Koyama R, Tao K, Sasaki T, Ichikawa J, Miyamoto D, Muramatsu R, et al. GABAergic excitation after febrile seizures induces ectopic granule cells and adult epilepsy. *Nat Med* 2012;18:1271–8.
 Lauri SE, Verbitskaya A, Segerstråle M, Collingridge GL, Isaac JTR, Taira T. Functional maturation of CA1 synapses involves activity-dependent loss of tonic kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release. *Neuron* 2006;50:415–29.
 Lilliu V, Perrone-Capano C, Pernal-Alonso R, Trelles RD, d'Amato GLC, Zuddas A, et al. Ontogeny of kainate receptor gene expression in the developing rat midbrain and striatum. *Brain Res Mol Brain Res* 2002;104:1–10.
 Mathew SS, Pozzo-Miller I, Hablitz JJ. Kainate modulates presynaptic GABA release from two vesicle pools. *J Neurosci* 2008;28:725–31.
 Mott DD, Rojas A, Fisher JL, Dingledine RJ, Benveniste M. Subunit-specific desensitization of heteromeric kainate receptors. *J Physiol* 2010;588:683–700.
 Mula M, Sander JW. Negative effects of antiepileptic drugs on mood in patients with epilepsy. *Drug Saf* 2007;30(7):555–67.
 Owens DF, Kriegstein AR. Developmental neurotransmitters? *Neuron* 2002a;36:989–91.
 Owens DF, Kriegstein AR. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* 2002b;3:715–27.
 Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 1997;17:3727–38.
 Pineda R, Beattie CE, Hall CW. Recording the adult zebrafish cerebral field potential during pentylentetrazole seizures. *J Neurosci Methods* 2011;20(1):20–8.
 Ribak CE, Navetta MS. An immature mossy fiber innervation of hilar neurons may explain their resistance to kainate-induced cell death in 15-day-old rats. *Brain Res Dev Brain Res* 1994;79:47–62.
 Ritter LM, Vazquez DM, Meador-Woodruff JH. Ontogeny of ionotropic glutamate receptor subunit expression in the rat hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* 2002;139:227–36.
 Salgado D, Marcelle C, Currie PD, Bryson-Richardson RJ. The Zebrafish Anatomy Portal: A novel integrated resource to facilitate zebrafish research. *Developmental Biology* 2012;372(1):1–4.
 Sadgrove MP, Chad JE, Gray WP. Kainic acid induces rapid cell death followed by transiently reduced cell proliferation in the immature granule cell layer of rat organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res* 2005;1035:111–9.
 Sihra TS, Rodríguez-Moreno A. Metabotropic actions of kainate receptors in the control of GABA release. *Adv Exp Med Biol* 2011;717:1–10.
 Slaughter LA, Patel AD, Slaughter JL. Pharmacological treatment of neonatal seizures: a systematic review. *J Child Neurol* 2013;28:351–64.
 Tandon P, Yang Y, Stafstrom CE, Holmes GL. Downregulation of kainate receptors in the hippocampus following repeated seizures in immature rats. *Brain Res Dev Brain Res* 2002;136:145–50.
 Wei H, Yao Y, Zhang R, Zhao X, Du J. Activity-induced long-term potentiation of excitatory synapses in developing zebrafish retina in vivo. *Neuron* 2012;75(3):479–89.
 Wilson SW, Houat C. Early steps in the development of the forebrain. *Developmental Cell* 2004;6(2):167–81.
 Ye CL, Song Liu X, Pasternak JF, Trommer BL. Maturation of glutamatergic neurotransmission in dentate gyrus granule cells. *Brain Res Dev Brain Res* 2000;124:33–42.
 Zhang K, Zhang Kun, Tolstikh GP, Sanchez RM, Cavazos JE. Chronic cellular hyperexcitability in elderly epileptic rats with spontaneous seizures induced by kainic acid status epilepticus while young adults. *Aging Dis* 2011;2(4):332–8.

Parte III

4 Discussão

Os receptores glutamatérgicos têm sido alvo de terapias para uma série de doenças neurológicas, ocorridas tanto em fase inicial do desenvolvimento quanto na fase adulta. Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos apresentam variações quanto as subunidades que os compõe e seguem não apenas uma cronologia, como também um controle de distribuição ao longo do desenvolvimento do sistema nervoso, o qual pode ser visto em mamíferos e em peixe-zebra (COX; KUCENAS; VOIGT, 2005; GIELEN et al., 2009; RITTER; VAZQUEZ; MEADOR-WOODRUFF, 2002).

O primeiro resultado apresentado nesta dissertação indica que a resposta comportamental ao MK-801, a qual é caracterizada principalmente pela hiperlocomoção, foi alcançada em animais com 60, 120 dias pós-fertilização e 2 anos pós-fertilização. A hiperlocomoção foi acompanhada por um aumento no tempo no topo do aquário, o qual tem sido um indicativo de ação ansiolítica. Animais mais jovens (30dpf) não apresentaram diferença na distancia percorrida ou padrão de exploração em relação aos animais controle. Estas diferentes respostas comportamentais ao longo do desenvolvimento podem estar ligadas à variação das subunidades que compões os receptores NMDA, visto que diferentes arranjos entre as subunidades que compões esses receptores alteram significativamente suas propriedades farmacocinéticas e sensibilidade (BOWIE, 2012; SWANSON et al., 2002). Os resultados da expressão das subunidades do receptor NMDA, em peixe-zebra, revelam a presença da subunidade NR1 em todas as idades testadas, corroborando com trabalhos anteriores realizados com roedores, que indicam a subunidade NR1 como uma unidade fundamental para formação de dímeros funcionais na formação do receptor NMDA (GIELEN et al., 2009). As subunidades NR2 apresentaram maior variabilidade nos níveis de expressão ao longo do desenvolvimento, o que pode explicar a variabilidade nas respostas à administração de MK-801, visto que as subunidades NR2 são determinantes no grau de afinidade dos receptores NMDA a este fármaco (MONAGHAN; LARSEN, 1997).

Ainda sobre a resposta ao MK-801, foi possível verificar que o bloqueio de receptores adenosinérgicos através da pré-exposição à cafeína foi capaz de prevenir

parcialmente a hiperlocomoção induzida por MK-801. Tal resposta se assemelha aquela vista em roedores onde ocorre uma tolerância cruzada entre a cafeína e o MK-801 (DALL'IGNA et al., 2003), reforçando a interação dos sistemas glutamatérgico e purinérgico e o paralelo entre as respostas a fármacos entre roedores e o peixe-zebra.

O segundo conjunto de resultados é relativo à resposta ao ácido caínico e seu uso para modelar a epilepsia. Embora a administração de ácido caínico nas fases iniciais do desenvolvimento já tenha sido demonstrada ser capaz de gerar descargas neuronais epileptiformes suficientes para interferir nos processos de proliferação neural (KIM et al., 2010), a locomoção destes animais não foi alterada de forma característica. Além disso, nas idades e doses testadas não foram registrados comportamentos epileptiformes como aqueles caracterizadas para outras drogas em fases iniciais do desenvolvimento do peixe-zebra (BARABAN et al., 2005). Nossos resultados revelaram que peixe-zebra exposto ao KA (100, 300 e 500 μ M) aos 7dpf (dias após a fecundação) apresentou atividade locomotora menor em relação aos controles, enquanto que os animais expostos aos 15 (KA 100 e 300 μ M) e 30 dpf (KA 100, 300 e 500 μ M) não exibiram nenhuma diferença significativa em relação ao controle. Uma possibilidade para essa diferença temporal na resposta ao ácido caínico é o fato de que em fases iniciais do desenvolvimento neural, células tipicamente excitatórias exibem predominantemente neurotransmissão via GABA (AMBROGINI et al., 2004; LAURI et al., 2006). Sendo assim, a influência do ácido caínico na liberação pré-sináptica do neurotransmissor GABA um dos fatores contribuintes para essa resposta hipolocomotora aos 7 dpf (COSSART et al., 2001; FISZMAN et al., 2007). Aos 15 dpf o KA na dose mais alta testada (500 μ M) foi capaz de aumentar significativamente a distância percorrida, apesar de não apresentar outros indícios visuais de convulsão.

Os animais que foram expostos ao KA aos 7dpf, mostraram-se resistentes a uma segunda exposição ao KA (6 mg/Kg, i.p.) aos 2mpf, em comparação com animais não expostos nas fases iniciais. Por outro lado animais expostos a 24hpf e 15dpf, não exibiram diferença significativa em relação ao grupo controle. Neste caso, o estado de maturação dos neurônios e o período de refinamento da rede neural devem ser considerados como possíveis desencadeadores desse quadro (BARABAN et al., 2005; DI MARCO et al., 2009; WEI et al., 2012).

5 Considerações Finais

Ao longo do desenvolvimento dos experimentos que compõem este trabalho foram encontrados resultados que culminaram nas seguintes conclusões:

- (1) Assim como em mamíferos o peixe-zebra apresenta seus níveis de expressão das subunidades que compõem o receptor NMDA sob um coordenado padrão de distribuição e cronologia ao longo do desenvolvimento que podem refletir na resposta diferenciada ao MK-801 ao longo do desenvolvimento;
- (2) Assim como em roedores, o peixe-zebra demonstrou ter a resposta hiperlocomotora, provocada pela exposição ao MK-801, atenuada pela pré-exposição crônica a cafeína;
- (3) Apesar de registros anteriores de ondas epileptiformes em larvas de peixe-zebra expostas ao ácido caínico, não há alterações comportamentais relacionáveis a convulsão e não há um padrão de locomoção também atribuível a esta condição quando o KA é diluído na água dos animais; e
- (4) O peixe-zebra demonstrou ter uma fase crítica em que uma perturbação na sinalização glutamatérgica, pela administração de ácido caínico diluído na água, pode causar efeitos permanentes na rede neural, acarretando em diferenciada sensibilidade a uma segunda exposição ao ácido caínico conhecidamente indutora de convulsão.

Este conjunto de resultados reforça a ideia da necessidade de estudos sobre a suscetibilidade do sistema nervoso em desenvolvimento às intervenções ao sistema glutamatérgico e seus reflexos em parâmetros comportamentais e locomotores que possam ser utilizados na modelagem de patologias utilizando o peixe zebra.

Referências

- AHLANDER, M. et al. A behavioral analysis of the spatial learning deficit induced by the NMDA receptor antagonist MK-801 (dizocilpine) in the rat. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 3, p. 414–426, 1999.
- AKAZAWA, C. et al. Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. **The Journal of comparative neurology**, v. 347, n. 1, p. 150–160, 1994.
- ALFARO, J. M.; RIPOLL-GÓMEZ, J.; BURGOS, J. S. Kainate administered to adult zebrafish causes seizures similar to those in rodent models. **The European journal of neuroscience**, v. 33, n. 7, p. 1252–5, abr. 2011.
- AMBROGINI, P. et al. Morpho-functional characterization of neuronal cells at different stages of maturation in granule cell layer of adult rat dentate gyrus. **Brain research**, v. 1017, n. 1-2, p. 21–31, 2004.
- ANDINÉ, P. et al. Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 290, n. 3, p. 1393–408, out. 1999.
- ANDRADE-TALAVERA, Y. et al. Pre-synaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves PKA and Ca(2+) -calmodulin at thalamocortical synapses. **Journal of neurochemistry**, v. 126, n. 5, p. 565–78, 2013.
- BARABAN, S. C. et al. Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. **Neuroscience**, v. 131, n. 3, p. 759–768, 2005.
- BAST, T. et al. Effects of MK801 and neuroleptics on prepulse inhibition: re-examination in two strains of rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 67, n. 3, p. 647–658, 2000.
- BELLOCCHIO, E. E. et al. Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. **Science (New York, N.Y.)**, v. 289, n. 5481, p. 957–960, 2000.
- BENGZON, J. et al. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 19, p. 10432–10437, 1997.
- BERTRAND, H.-O. et al. Common and selective molecular determinants involved in metabotropic glutamate receptor agonist activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 15, p. 3171–3183, 2002.
- BLANDINI, F.; PORTER, R. H.; GREENAMYRE, J. T. Glutamate and Parkinson's disease. **Molecular neurobiology**, v. 12, n. 1, p. 73–94, 1996.
- BOWIE, D. Redefining the classification of AMPA-selective ionotropic glutamate receptors. **The Journal of physiology**, v. 590, n. Pt 1, p. 49–61, 2012.

- BROSNAN, J. T.; BROSNAN, M. E. Glutamate: a truly functional amino acid. **Amino acids**, 18 abr. 2012.
- BUSKE, C.; GERLAI, R. Shoaling develops with age in Zebrafish (*Danio rerio*). **Progress in neuropsychopharmacology biological psychiatry**, v. 35, n. 6, p. 1409–1415, 2011.
- CAREY, R. J.; DAI, H.; GUI, J. Effects of dizocilpine (MK-801) on motor activity and memory. **Psychopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 241–246, 1998.
- CASTILLO, P. E.; MALENKA, R. C.; NICOLL, R. A. Kainate receptors mediate a slow postsynaptic current in hippocampal CA3 neurons. **Nature**, v. 388, n. 6638, p. 182–6, 10 jul. 1997.
- CHAMPAGNE, D. L. et al. Behavioral performance altering effects of MK-801 in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 220, n. 2, p. 332–342, 2010.
- CHEN, J. et al. The Behavioral and Pharmacological Actions of NMDA Receptor Antagonism are Conserved in Zebrafish Larvae. **International Journal of Comparative Psychology**, v. 23, n. 1, p. 82–90, 2010.
- CHU, Z.; HABLITZ, J. J. Quisqualate induces an inward current via mGluR activation in neocortical pyramidal neurons. **Brain Research**, v. 879, n. 1-2, p. 88–92, 2000.
- COSSART, R. et al. Presynaptic kainate receptors that enhance the release of GABA on CA1 hippocampal interneurons. **Neuron**, v. 29, n. 2, p. 497–508, 2001.
- COX, J. A.; KUCENAS, S.; VOIGT, M. M. Molecular characterization and embryonic expression of the family of N-methyl-D-aspartate receptor subunit genes in the zebrafish. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 234, n. 3, p. 756–66, dez. 2005.
- COYLE, J. T.; PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science (New York, N.Y.)**, v. 262, n. 5134, p. 689–695, 1993.
- DA SILVA, R. S. et al. Maternal caffeine intake impairs MK-801-induced hyperlocomotion in young rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 509, n. 2-3, p. 155–159, 2005.
- DALL'IGNA, O. P. et al. Chronic treatment with caffeine blunts the hyperlocomotor but not cognitive effects of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 in mice. **Psychopharmacology**, v. 166, n. 3, p. 258–63, mar. 2003.
- DI MARCO, S. et al. Permanent functional reorganization of retinal circuits induced by early long-term visual deprivation. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 43, p. 13691–13701, 2009.
- DUNCAN, G. E. et al. NIH Public Access. p. 166–176, 2011.
- FARLEY, S. et al. **Increased expression of the Vesicular Glutamate Transporter-1 (VGLUT1) in the prefrontal cortex correlates with differential vulnerability to chronic stress in various mouse strains: Effects of fluoxetine and MK-801** *Neuropharmacology*, 2012.

- FISZMAN, M. L. et al. Presynaptic AMPA and kainate receptors increase the size of GABAergic terminals and enhance GABA release. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 8, p. 1631–1640, 2007.
- FLINT, R. W.; NOBLE, L. J.; ULMEN, A. R. NMDA receptor antagonism with MK-801 impairs consolidation and reconsolidation of passive avoidance conditioning in adolescent rats: Evidence for a state dependent reconsolidation effect. **Neurobiology of learning and memory**, v. 101, p. 114–9, 2013.
- FORREST, D. et al. Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. **Neuron**, v. 13, n. 2, p. 325–338, 1994.
- FRASER, C. M. et al. The involvement of adenosine receptors in the effect of dizocilpine on mice in the elevated plus-maze. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 7, n. 4, p. 267–73., 1997.
- GIELEN, M. et al. Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. **Nature**, v. 459, n. 7247, p. 703–707, 2009.
- GISABELLA, B.; BOLSHAKOV, V. Y.; BENES, F. M. Kainate receptor-mediated modulation of hippocampal fast spiking interneurons in a rat model of schizophrenia. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e32483, jan. 2012.
- GORDON, J. A. **Testing the glutamate hypothesis of schizophrenia. Nature neuroscience**, 2010.
- HAAS, K. Z. et al. Resistance of immature hippocampus to morphologic and physiologic alterations following status epilepticus or kindling. **Hippocampus**, v. 11, n. 6, p. 615–625, 2001.
- HABERNY, K. A. et al. Ontogeny of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor system and susceptibility to neurotoxicity. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 68, n. 1, p. 9–17, 2002.
- HALL, C.; L, E. A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. **University of California Publications in Psychology**, v. 6, p. 1–12, 1932.
- HARGREAVES, E. L.; CAIN, D. P. Hyperactivity, hyper-reactivity, and sensorimotor deficits induced by low doses of the N-methyl-D-aspartate non-competitive channel blocker MK801. **Behavioural brain research**, v. 47, n. 1, p. 23–33, 1992.
- HARRISON, P. J.; WEINBERGER, D. R. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. **Molecular psychiatry**, v. 10, n. 1, p. 40–68; image 5, 2005.
- HLINÁK, Z.; KREJČÍ, I. MK-801 induced amnesia for the elevated plus-maze in mice. **Behavioural brain research**, v. 131, n. 1-2, p. 221–225, 2002.
- HOLOPAINEN, I. E. Seizures in the developing brain: cellular and molecular mechanisms of neuronal damage, neurogenesis and cellular reorganization. **Neurochemistry International**, v. 52, n. 6, p. 935–947, 2008.

- HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013.
- HUETTNER, J. E. Kainate receptors and synaptic transmission. **Progress in Neurobiology**, v. 70, n. 5, p. 387–407, ago. 2003.
- HYND, M. R.; SCOTT, H. L.; DODD, P. R. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Neurochemistry international**, v. 45, n. 5, p. 583–595, 2004.
- IKONOMIDOU, C.; TURSKI, L. Excitotoxicity and neurodegenerative diseases. **Current opinion in neurology**, v. 8, n. 6, p. 487–497, 1995.
- IKONOMIDOU, C.; TURSKI, L. Neurodegenerative disorders: clues from glutamate and energy metabolism. **Critical reviews in neurobiology**, v. 10, n. 2, p. 239–263, 1996.
- JOHNSON, J. W.; ASCHER, P. Voltage-dependent block by intracellular Mg²⁺ of N-methyl-D-aspartate-activated channels. **Biophysical Journal**, v. 57, n. 5, p. 1085–1090, 1990.
- KIM, Y.-H. et al. Reduced neuronal proliferation by proconvulsant drugs in the developing zebrafish brain. **Neurotoxicology and teratology**, v. 32, n. 5, p. 551–7, 2010.
- KOH, S. et al. Early-life seizures in rats increase susceptibility to seizure-induced brain injury in adulthood. **Neurology**, v. 53, n. 5, p. 915–921, 1999.
- KOKAIA, M. Seizure-induced neurogenesis in the adult brain. **Eur J Neurosci**, v. 33, n. 6, p. 1133–1138, 2011.
- KONRADI, C.; HECKERS, S. Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. **Pharmacology & therapeutics**, v. 97, n. 2, p. 153–179, 2003.
- KUMAR, J.; SCHUCK, P.; MAYER, M. L. Structure and assembly mechanism for heteromeric kainate receptors. **Neuron**, v. 71, n. 2, p. 319–331, 2011.
- KUTSUWADA, T. et al. Molecular diversity of the NMDA receptor channel. **Nature**, v. 358, n. 6381, p. 36–41, 1992.
- LAURI, S. E. et al. Functional maturation of CA1 synapses involves activity-dependent loss of tonic kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release. **Neuron**, v. 50, n. 3, p. 415–429, 2006.
- LEE, J.-G.; LEE, K.-P.; JEON, C.-J. Synaptic Pattern of KA1 and KA2 upon the Direction-Selective Ganglion Cells in Developing and Adult Mouse Retina. **Acta histochemica et cytochemica**, v. 45, n. 1, p. 35–45, 2012.
- LESTER, R. A. et al. Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 565–567, 1990.
- LILLIU, V. et al. Ontogeny of kainate receptor gene expression in the developing rat midbrain and striatum. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 104, n. 1, p. 1–10, 2002.

- LIU, Y.; VON EULER, G. Na⁺, K⁺ and Ca²⁺ antagonize the glutamate- and glycine-induced decrease of [3H]MK-801 binding observed in the presence of Mg²⁺ at low pH. **Neurochemistry international**, v. 34, n. 4, p. 291–301, abr. 1999.
- LOPACHIN, R. M. et al. Effects of ion channel blockade on the distribution of Na, K, Ca and other elements in oxygen-glucose deprived CA1 hippocampal neurons. **Neuroscience**, v. 103, n. 4, p. 971–983, 2001.
- MALI, R. S.; ZHANG, X. M.; CHINTALA, S. K. A decrease in phosphorylation of cAMP-response element-binding protein (CREBP) promotes retinal degeneration. **Experimental Eye Research**, v. 92, n. 6, p. 528–536, 2011.
- MANAHAN-VAUGHAN, D. et al. A single application of MK801 causes symptoms of acute psychosis, deficits in spatial memory, and impairment of synaptic plasticity in rats. **Hippocampus**, v. 18, n. 2, p. 125–134, 2008.
- MANENT, J.-B. et al. A noncanonical release of GABA and glutamate modulates neuronal migration. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 19, p. 4755–4765, 2005.
- MANENT, J.-B. et al. Glutamate acting on AMPA but not NMDA receptors modulates the migration of hippocampal interneurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 22, p. 5901–5909, 2006.
- MANEV, H. et al. Abusive stimulation of excitatory amino acid receptors: a strategy to limit neurotoxicity. **The FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 4, n. 10, p. 2789–2797, 1990.
- MCKHANN, G. M. et al. Mouse strain differences in kainic acid sensitivity, seizure behavior, mortality, and hippocampal pathology. **Neuroscience**, v. 122, n. 2, p. 551–561, 2003.
- MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1007S–15S, 2000.
- MONAGHAN, D. T.; LARSEN, H. NR1 and NR2 subunit contributions to N-methyl-D-aspartate receptor channel blocker pharmacology. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 280, n. 2, p. 614–620, 1997.
- MONYER, H. et al. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. **Neuron**, v. 12, n. 3, p. 529–540, 1994.
- MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 11, n. 1, p. 47–60, 1984.
- MOTT, D. D. et al. Subunit-specific desensitization of heteromeric kainate receptors. **The Journal of physiology**, v. 588, n. Pt 4, p. 683–700, 2010.
- MUKHERJEE, S.; MANAHAN-VAUGHAN, D. Role of metabotropic glutamate receptors in persistent forms of hippocampal plasticity and learning. **Neuropharmacology**, n. June, p. 1–16, 26 jun. 2012.
- MULLE, C. et al. Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. **Nature**, v. 392, n. 6676, p. 601–605, 1998.

MUSAZZI, L. et al. The action of antidepressants on the glutamate system: regulation of glutamate release and glutamate receptors. **Biological psychiatry**, v. 73, n. 12, p. 1180–8, 2013.

NANSEN, E. A. et al. Striatal ionotropic glutamate receptor ontogeny in the rat. **Developmental neuroscience**, v. 22, n. 4, p. 329–340, 2000.

NEALE, S. A.; COPELAND, C. S.; SALT, T. E. Effect of VGLUT inhibitors on glutamatergic synaptic transmission in the rodent hippocampus and prefrontal cortex. **Neurochemistry international**, p. 1–7, 2013.

NICHOLLS, D.; ATTWELL, D. The release and uptake of excitatory amino acids. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 11, n. 11, p. 462–468, 1990.

NICHOLLS, D. G.; SIHRA, T. S.; SANCHEZ-PRIETO, J. Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. **Journal of Neurochemistry**, v. 49, n. 1, p. 50–57, 1987.

NITECKA, L. et al. Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat. II. Histopathological sequelae. **Neuroscience**, v. 13, n. 4, p. 1073–1094, 1984.

O'SHEA, R. D. et al. Evaluation of drugs acting at glutamate transporters in organotypic hippocampal cultures: new evidence on substrates and blockers in excitotoxicity. **Neurochemical research**, v. 27, n. 1-2, p. 5–13, 2002.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in neurobiology**, v. 54, n. 5, p. 581–618, maio 1998.

PARENT, J. M. et al. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 17, n. 10, p. 3727–3738, 1997.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 14, n. 3, p. 149–167, 1985.

PESIĆ, V. et al. The effect of MK-801 on motor activity and c-Fos protein expression in the brain of adolescent Wistar rats. **Brain research**, v. 1321, p. 96–104, 2010.

PINHEIRO, P.; MULLE, C. Kainate receptors. **Cell and tissue research**, v. 326, n. 2, p. 457–82, dez. 2006.

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

RITTER, L. M.; UNIS, A. S.; MEADOR-WOODRUFF, J. H. Ontogeny of ionotropic glutamate receptor expression in human fetal brain. **Brain research. Developmental brain research**, v. 127, n. 2, p. 123–133, 2001.

RITTER, L. M.; VAZQUEZ, D. M.; MEADOR-WOODRUFF, J. H. Ontogeny of ionotropic glutamate receptor subunit expression in the rat hippocampus. **Brain research. Developmental brain research**, v. 139, n. 2, p. 227–236, 2002.

- RODRÍGUEZ-MORENO, A.; SIHRA, T. S. Presynaptic kainate receptor facilitation of glutamate release involves protein kinase A in the rat hippocampus. **The Journal of physiology**, v. 557, n. Pt 3, p. 733–745, 2004.
- RODRÍGUEZ-MORENO, A.; SIHRA, T. S. Metabotropic actions of kainate receptors in the CNS. **Journal of neurochemistry**, v. 103, n. 6, p. 2121–35, dez. 2007.
- RUNG, J. P. et al. (+)-MK-801 induced social withdrawal in rats; a model for negative symptoms of schizophrenia. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 29, n. 5, p. 827–32, jul. 2005.
- SADGROVE, M. P.; CHAD, J. E.; GRAY, W. P. Kainic acid induces rapid cell death followed by transiently reduced cell proliferation in the immature granule cell layer of rat organotypic hippocampal slice cultures. **Brain research**, v. 1035, n. 2, p. 111–119, 2005.
- SCHMITZ, D.; MELLOR, J.; NICOLL, R. A. Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. **Science (New York, N.Y.)**, v. 291, n. 5510, p. 1972–6, 9 mar. 2001.
- SCHÜLER, T. et al. Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 1, p. 37–46, 2008.
- SEIBT, K. J. et al. Antipsychotic drugs prevent the motor hyperactivity induced by psychotomimetic MK-801 in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural brain research**, v. 214, n. 2, p. 417–22, 25 dez. 2010.
- SEIBT, K. J. et al. Antipsychotic drugs reverse MK-801-induced cognitive and social interaction deficits in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural brain research**, v. 224, n. 1, p. 135–9, 10 out. 2011.
- SHIGERI, Y.; SEAL, R. P.; SHIMAMOTO, K. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. **Brain research. Brain research reviews**, v. 45, n. 3, p. 250–265, 2004.
- SIMEONE, T. A.; SANCHEZ, R. M.; RHO, J. M. **Molecular Biology and Ontogeny of Glutamate Receptors in the Mammalian Central Nervous System** *Journal of Child Neurology*, 2004.
- SISON, M.; GERLAI, R. Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*) in the plus maze. **Behavioural Brain Research**, v. 207, n. 1, p. 99–104, 2010.
- STEPHENSON, F. A. Structure and trafficking of NMDA and GABA A receptors. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, n. Pt 5, p. 877–881, 2006.
- SWAIN, H. A.; SIGSTAD, C.; SCALZO, F. M. Effects of dizocilpine (MK-801) on circling behavior, swimming activity, and place preference in zebrafish (*Danio rerio*). **Neurotoxicology and teratology**, v. 26, n. 6, p. 725–9, 2004.
- SWANSON, G. T. et al. Differential activation of individual subunits in heteromeric kainate receptors. **Neuron**, v. 34, n. 4, p. 589–598, 2002.

TANDON, P. et al. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in seizures during development. **Neuroscience**, v. 91, n. 1, p. 293–303, 1999.

TURSKI, L.; TURSKI, W. A. Towards an understanding of the role of glutamate in neurodegenerative disorders: energy metabolism and neuropathology. **Experientia**, v. 49, n. 12, p. 1064–1072, 1993.

TYLICKI, A.; BUNIK, V. I.; STRUMIŁO, S. [2-Oxoglutarate dehydrogenase complex and its multipoint control]. **Postepy Biochemii**, v. 57, n. 3, p. 304–13, 2011.

VAN DER STAAY, F. J. et al. Effects of the cognition impairer MK-801 on learning and memory in mice and rats. **Behavioural brain research**, v. 220, n. 1, p. 215–229, 2011.

WEI, H. et al. **Activity-Induced Long-Term Potentiation of Excitatory Synapses in Developing Zebrafish Retina In Vivo** *Neuron*, 2012.

WERNER, P. et al. Cloning of a putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. **Nature**, v. 351, n. 6329, p. 742–744, 1991.

WILDING, T. J.; HUETTNER, J. E. Functional diversity and developmental changes in rat neuronal kainate receptors. **The Journal of Physiology**, v. 532, n. Pt 2, p. 411–421, 2001.

WILKINSON, R. J.; NICHOLLS, D. G. Compartmentation of glutamate and aspartate within cerebral cortical synaptosomes: evidence for a non-cytoplasmic origin for the calcium-releasable pool of glutamate. **Neurochemistry international**, v. 15, n. 2, p. 191–7, jan. 1989.

WISDEN, W.; SEEBURG, P. H. A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. **Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 8, p. 3582–3598, 1993.

WULLNER, U. et al. Differential expression of kainate receptors in the basal ganglia of the developing and adult rat brain. **Brain Research**, v. 768, n. 1-2, p. 215–223, 1997.

ZAMANILLO, D. et al. Importance of AMPA receptors for hippocampal synaptic plasticity but not for spatial learning. **Science**, v. 284, n. 5421, p. 1805–11, 1999.

ZAMZOW, C. R.; BOSE, R.; PARKINSON, F. E. N-methyl-D-aspartate-evoked adenosine and inosine release from neurons requires extracellular calcium. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 87, n. 10, p. 850–858, 2009.

ZERANGUE, N.; KAVANAUGH, M. P. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. **Nature**, v. 383, n. 6601, p. 634–637, 1996.

ZHANG, G. et al. Long-term alterations in glutamate receptor and transporter expression following early-life seizures are associated with increased seizure susceptibility. **Journal of neurochemistry**, v. 88, n. 1, p. 91–101, 2004.

ANEXO A – Parecer da banca examinadora

Parecer descritivo da Dissertação de Fabiano Peres Menezes

Trata-se de um interessante trabalho que avaliou a ontogenia das respostas comportamentais a agentes glutamatérgicos, assim com a expressão de diversas subunidades dos receptores NMDA em peixe zebra.

De modo geral, a dissertação é bem escrita, bem organizada e contém informações aprofundadas e relevantes. A revisão da literatura também cobriu bem a área.

O trabalho tem o mérito de cobrir uma área em que há ainda poucos dados, usando um protocolo bem feito por ter testado várias doses de MK-801 e em diversas fases do desenvolvimento, avaliando 3 parâmetros comportamentais diferentes (locomoção, altura no aquário e convulsão por kainato). Do ponto de vista metodológico, só senti falta da avaliação do efeito da cafeína crônica sobre o aumento da altura no aquário com MK-801.

Quanto aos artigos, estão bem estruturados e bem escritos, mas carecem de revisão da língua inglesa.

Por todos esse motivos, considero o aluno aprovado, fazendo jus ao título de mestre.



Diogo Rizzato Lara



FICHA DE AVALIAÇÃO DE DISSERTAÇÃO

Aluno (a): FABIANO PERES MENEZES

Orientador (a): Rosane Souza da Silva

Título: "Avaliação da sinalização glutamatérgica ao longo do desenvolvimento do peixe-zebra (*Danio rerio*) e suas implicações comportamentais e motoras"

Avaliador (a): Diogo Losch de Oliveira

1. APRESENTAÇÃO FORMAL DO TEXTO:

1.1. Qualidade de apresentação de figuras e tabelas:

Plenamente Satisfatória Satisfatória Insuficiente

1.2. Correção ortográfica e gramatical:

Plenamente Satisfatória Satisfatória Insuficiente

1.3. Característica da linguagem quanto à precisão e objetividade?

Plenamente Satisfatória Satisfatória Insuficiente

2. ORIGINALIDADE E RELEVÂNCIA DA PESQUISA:

2.1. O trabalho constitui-se em pesquisa original?

Sim Não

2.2. O trabalho apresenta relevância científica?

Sim Não

3. A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA É SUFICIENTE E ADEQUADA AOS OBJETOS PROPOSTOS?

Sim Parcialmente Não

4. A METODOLOGIA É ADEQUADA AOS OBJETIVOS PROPOSTOS?

Sim Parcialmente Não

5. OS RESULTADOS ALCANÇADOS SÃO RELEVANTES E CONSISTENTES?

Sim Parcialmente Não

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO:

6.1. Os resultados são discutidos com argumentação relevante e consistente?

Sim Parcialmente Não

6.2. As conclusões são consistentes?

Sim Parcialmente Não

8. ELABORE E ANEXE A ESTA FICHA UM PARECER DESCRITIVO SOBRE O TRABALHO.

INDIQUE NO QUADRO ABAIXO SE CONSIDERA O ALUNO (A) APROVADO OU REPROVADO

APROVADO

LOCAL E DATA: Porto Alegre, 06 de março de 2014.

ASSINATURA:



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CB: BIOQUÍMICA
RUA RAMIRO BARCELOS, 2600 - ANEXO
FONE: 051 3316 5539 - FAX 051 3316 5540
CEP 90035-003 - PORTO ALEGRE- RS

Porto Alegre, 22 de agosto de 2011.

À Profa. Dra. Nádia Schroder
Coordenadora do PPG em Biologia Celular e Molecular
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

PARECER DESCRITIVO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Título: Avaliação da sinalização glutamatérgica ao longo do desenvolvimento do peixe-zebra (*Danio rerio*) e suas implicações comportamentais e motoras.

Autor: Fabiano Peres Menezes

Orientador: Profa. Dra. Rosane Souza da Silva

A presente dissertação procurou avaliar as alterações comportamentais induzidas pelo tratamento com Mk-801 ao longo do desenvolvimento em peixe-zebra. Além disso, procurou também avaliar a expressão das subunidades de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA ao longo do desenvolvimento em peixe-zebra. A dissertação está bem escrita e apresenta uma revisão da literatura científica adequada. A metodologia está adequada aos objetivos propostos e a discussão engloba os resultados obtidos sem existência de especulações. Finalmente, considero a dissertação excelente no que diz respeito a sua produção científica, sendo que os resultados apresentados serviram como base para a publicação de artigos científicos, os quais contribuirão para a divulgação da linha de pesquisa desenvolvida pelo grupo. Abaixo seguem algumas sugestões:

- Parte I, Introdução (pág. 11): sugiro atualizar a nomenclatura dos transportadores de glutamato (de GLT-1 para EAAT2, por exemplo). Também surgido incluir todos os membros na descrição (EATT1-5) e mencionar que esta classificação é utilizada para os sub-tipos descritos somente para mamíferos.

- Parte I, Introdução (pág. 13): enfatizar que a classificação e variabilidade de subunidades descrita no segundo parágrafo referem-se somente aquelas subunidades descritas para mamíferos.

- Parte II, Resultados, Artigos científico 1 (pág. 32): Na seção 3. Results, ao final do segundo parágrafo, a sentença "at 5uM for both and at 20 uM for 120 days-old animals" parece confusa.

- Parte II, Resultados, Artigos científico 1: como sugestão, seria interessante para a interpretação dos achados relativos as alterações comportamentais induzidas pelo MK-801, incluir no artigo a expressão das subunidades do receptor NMDA nos animais de 2 anos de idade (pág. 45).

Sem para o momento, sou de parecer favorável a aprovação do aluno.



Pro. Flávio Losch de Oliveira
Departamento de Bioquímica - ICBS
PPG em Ciências Biológicas Bioquímica
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

FICHA DE AVALIAÇÃO DE DISSERTAÇÃO

Aluno (a): FABIANO PERES MENEZES

Orientador (a): Rosane Souza da Silva

Título: "Avaliação da sinalização glutamatérgica ao longo do desenvolvimento do peixe-zebra (*Danio rerio*) e suas implicações comportamentais e motoras"

Avaliador (a): Carina Rodrigues Boeck

1. APRESENTAÇÃO FORMAL DO TEXTO:

1.1. Qualidade de apresentação de figuras e tabelas:

Plenamente Satisfatória () Satisfatória () Insuficiente

1.2. Correção ortográfica e gramatical:

Plenamente Satisfatória () Satisfatória () Insuficiente

1.3. Característica da linguagem quanto à precisão e objetividade?

Plenamente Satisfatória () Satisfatória () Insuficiente

2. ORIGINALIDADE E RELEVÂNCIA DA PESQUISA:

2.1. O trabalho constitui-se em pesquisa original?

Sim () Não

2.2. O trabalho apresenta relevância científica?

Sim () Não

3. A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA É SUFICIENTE E ADEQUADA AOS OBJETOS PROPOSTOS?

Sim () Parcialmente () Não

4. A METODOLOGIA É ADEQUADA AOS OBJETIVOS PROPOSTOS?

Sim () Parcialmente () Não

5. OS RESULTADOS ALCANÇADOS SÃO RELEVANTES E CONSISTENTES?

Sim () Parcialmente () Não

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO:

6.1. Os resultados são discutidos com argumentação relevante e consistente?

() Sim Parcialmente () Não

6.2. As conclusões são consistentes?

Sim () Parcialmente () Não

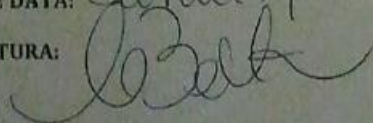
8. ELABORE E ANEXE A ESTA FICHA UM PARECER DESCRITIVO SOBRE O TRABALHO.

INDIQUE NO QUADRO ABAIXO SE CONSIDERA O ALUNO (A) APROVADO OU REPROVADO

APROVADO

LOCAL E DATA: Santa Maria, 28 de fevereiro de 2014

ASSINATURA:



Santa Maria, 28/02/2014

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

Sra. Profa. Dra. Nadja Schoroder

Em atenção à sua solicitação, envio o parecer da dissertação do aluno Fabiano Perez Menezes. Aproveito a oportunidade para reiterar o meu agradecimento pela indicação nessa avaliação e a minha disponibilidade para futuros trabalhos.

Atenciosamente

Carina Rodrigues Boeck

Parecer descritivo

Aluno: Fabiano Perez Menezes

Título: Avaliação da sinalização glutamatérgica ao longo do desenvolvimento do peixe-zebra (*Danio rerio*) e suas implicações comportamentais e motoras

Abaixo descrevo as minhas considerações:

Resumo: Apresenta de forma geral o trabalho. Os objetivos devem estar claramente apresentados. Os demais itens foram contemplados mantendo uma lógica que abrange os pontos principais do estudo.

Sugestão de correção: após escolher a sigla KA para o ácido caínico, mantê-la sempre que citar a substância. Na descrição metodológica está descrito que será avaliada a atividade locomotora após KA, mas na apresentação dos resultados o aluno fala de convulsões. O que foi avaliado? Isso deve estar especificado. Incluir uma frase de discussão/conclusão.

Índice de Figuras: Sugestão de correção: adicionar todas as figuras apresentadas no trabalho.

Lista de Siglas: Sugestão de correção: ordenar alfabeticamente. NMDA também é sigla do inglês N-Methyl-D-aspartate.

Introdução: Sugestão de correção: adicionar legenda para a figura 1. A nota que consta nas figuras 2 e 3 pode ser a sua legenda. Desde que dissertações e teses são trabalhos de conclusão disponíveis à comunidade em geral, não somente acadêmica, sugiro adaptar as figuras e traduzir os termos que nelas aparecem. Acrescentar ao final da introdução um parágrafo de justificativa.

Artigos: incluir quais foram os fatores de comparação utilizados para a análise estatística de duas vias. Há referências para as doses escolhidas de KA?

Discussão: peço que o aluno seja menos direto na constatação biológica/funcional dos receptores NMDA ao relacionar o efeito observado com a expressão das subunidades. É importante ter atenção no que se refere a translocação do receptor depois da proteína estar organizado. A ação do receptor na célula depende da sua disponibilidade na membrana plasmática, isso inclui translocação e ancoramento. As afirmações a respeito da farmacocinética do MK-801, feita pelo autor na discussão do Artigo 1 e na dissertação, direciona a um entendimento equivocado, de que a expressão do receptor está diretamente relacionado a sua atividade. Peço que ao discutir tais resultados, acrescente dados de translocação e ancoramento. Sugiro que em trabalhos futuros seja avaliado o conteúdo do receptor no tecido cerebral e a sua atividade, pois complementaria os dados obtidos aqui e também possibilitaria abranger as ações de pesquisa que envolva os receptores NMDA no modelo animal do peixe zebra.

Sugestão de correção: o primeiro parágrafo da discussão é uma justificativa. Sugiro coloca-lo ao final da introdução.

Considerações finais: o trabalho está adequadamente apresentado, seguindo um pensamento lógico na sua organização e descrição dos itens. É inovador e extremamente importante para o conhecimento do funcionamento cerebral nesse modelo animal tão bem explorado na atualidade. Tenho certeza de que os trabalhos serão publicados brevemente.



Carina Rodrigues Boeck
Programa de Pós-graduação em Nanociências
Centro Universitário Franciscano-UNIFRA
Santa Maria, RS