



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Farmácia
Mestrado Profissional em Biotecnologia Farmacêutica

Avaliação do papel do sistema purinérgico e dopaminérgico no efeito antidepressivo promovido por MK-801 em peixe-zebra (*Danio rerio*)

Autor

Raquel Bohrer da Silva Souza

Orientador

Prof^a Dr^a Carla Denise Bonan

Porto Alegre

2015



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Farmácia
Mestrado Profissional em Biotecnologia Farmacêutica

Avaliação do papel do sistema purinérgico e dopaminérgico no efeito antidepressivo promovido por MK-801 em peixe-zebra (*Danio rerio*)

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre pelo Mestrado Profissional em Biotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Autor

Raquel Bohrer da Silva Souza

Orientador

Prof^a Dr^a Carla Denise Bonan

Porto Alegre

2015

RAQUEL BOHRER DA SILVA SOUZA

Avaliação do papel do sistema purinérgico e dopaminérgico no efeito antidepressivo promovido por MK-801 em peixe-zebra (Danio rerio)

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Mestrado Profissional em Biotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira - PUCRS

Prof^a. Dr^a. Manuella Pinto Kaster - UFSC

Prof^a. Dr^a. Carina Rodrigues Boeck - UNIFRA

Porto Alegre

2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a minha orientadora Prof^a Dr^a Carla Denise Bonan, por mesmo sem conhecer a mim ou meu trabalho, acreditar que eu era capaz. Obrigada pela oportunidade, orientação, compreensão dos meus horários malucos, paciência e dedicação.

Ao meu esposo por compreender a ausência, a impaciência, o cansaço. Por me acalmar na hora em que a melhor opção era desistir.

A família por entender a ausência e vibrar com meu crescimento pessoal e profissional.

A minha querida amiga Anna Maria Siebel pelo companheirismo, paciência e dedicação. Teus conselhos e ensinamentos foram essenciais para que este trabalho pudesse ser construído. Obrigada pela ajuda nas longas horas de experimento, na análise de cada resultado, na construção de cada gráfico.

A amiga Gabriela Lucas pelo incentivo e empurrão inicial para realizar o sonho antigo que havia se perdido no tempo.

Aos colegas e alunos da Escola Superior e Técnica Factum pelo apoio e reconhecimento.

Aos colegas do Mestrado Profissional em Biotecnologia Farmacêutica pelas risadas, discussões, palavras de carinho. Com vocês as longas tardes e noites de sexta-feira ficaram mais leves.

Aos professores do Mestrado Profissional em Biotecnologia Farmacêutica pelos ensinamentos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A depressão é uma doença grave, recorrente, caracterizada por anedonia, perda de interesse em atividades diárias, distúrbios do apetite e do sono, concentração reduzida e agitação psicomotora. Os fármacos antidepressivos utilizados atualmente têm um início de ação muito lento, com isso, surge a necessidade de tratamentos de ação rápida. Portanto, há um interesse crescente em antagonistas de receptores NMDA como um alvo para o desenvolvimento de novos fármacos antidepressivos. Considerando-se que os sistemas purinérgicos e dopaminérgicos estão envolvidos na ansiedade, sono e depressão, caracterizamos o papel destas vias de sinalização sobre os efeitos antidepressivos induzidos por MK-801, um antagonista NMDA, em peixe-zebra. Os animais tratados com MK-801 em doses de 5, 10, 15 e 20 μM durante 15, 30 e 60 minutos apresentaram maior permanência na área superior do aquário, em comparação com o grupo controle, indicando um efeito antidepressivo induzido por este composto. Os animais tratados com MK-801 permaneceram até 2 horas na parte superior do aquário quando tratados com 5 μM de MK-801 e 4 horas quando tratados com 20 μM MK-801, retornando aos parâmetros basais após 24 horas de exposição. O tratamento repetido não induziu efeitos cumulativos, uma vez que os animais tratados diariamente durante sete dias apresentaram o mesmo padrão de resposta comportamental observada desde o primeiro até o dia 7^o dia. Com o objetivo de investigar a ação dos agonistas e antagonistas dos receptores A_1 e A_{2A} e a influência da modulação dos níveis de adenosina nos efeitos antidepressivos induzidos por MK-801, os animais foram pré-tratados com cafeína, DPCPX, CPA, ZM 241385, CGS 21680, AMPCP, EHNA, Dipyridamol e NBTI por 30 minutos antes da exposição ao MK-801. O antagonista não seletivo de receptores de adenosina cafeína (50 mg/kg) e o antagonista seletivo do receptor A_1 DPCPX (15 mg/kg) bloquearam as alterações comportamentais induzido pelo MK-801. O Dipyridamol (10 mg/kg), um inibidor não seletivo do transportador de nucleosídeo (NT), exacerbou as alterações comportamentais induzidos pelo MK-801. Os antagonistas dos receptores de dopamina (sulpirida e SCH23390) não apresentaram modificações nas alterações comportamentais induzidas por MK-801. Os nossos resultados sugerem que o efeito antidepressivo induzido por MK-801 em peixe-zebra é mediado principalmente pela ativação do receptor de adenosina A_1 .

ABSTRACT

Depression is a serious and recurrent disease characterized by anhedonia, loss of interest in daily activities, appetite, and sleep disturbances, reduced concentration and psychomotor agitation. Antidepressant drugs currently used have a very slow onset of action, with that comes the need for fast-acting treatments. Therefore, there is a growing interest in NMDA antagonists as a target for the development of new antidepressant drugs. Considering that the purinergic and dopaminergic systems are involved in anxiety, depression, and sleep, we characterize the role of these signaling pathways on antidepressant effects induced by MK-801 in zebrafish. The animals treated with MK-801 at 5, 10, 15, and 20 μM during 15, 30, and 60 minutes showed higher permanence in the top area of the tank, in comparison with the control group, indicating an antidepressant effect induced by this drug. The animals treated with MK-801 remained within 2 hours in the top of the tank when treated with 5 μM MK-801 and 4 hours when treated with 20 μM MK-801, returning to basal levels 24 hours after exposure. The repeated treatment did not induce cumulative effects, since animals treated daily for seven days showed the same pattern of behavioral response observed from the first day until the 7th day. In order to investigate the action of agonists and antagonists of A_1 and A_{2A} receptors and the influence of modulation on adenosine levels in antidepressant effects induced by MK-801, animals were pretreated with Caffeine, DPCPX, CPA, ZM 241385, CGS 21680, AMPCP, EHNA, dipyridamole, and NBTI before the exposure to MK-801 for 30 minutes. The nonselective adenosine receptor antagonist Caffeine (50 mg/kg) and the selective A_1 adenosine receptor antagonist DPCPX (15 mg/kg) blocked the behavioral changes induced by MK-801. Dipyridamole (10 mg/kg), a selective inhibitor of nucleoside transport (NT), exacerbates the behavioral changes induced by MK-801. Dopamine receptor antagonists (sulpiride and SCH23390) did not induce changes on the behavioral alterations induced by MK-801. Our results have shown that the antidepressant effects induced by MK-801 in zebrafish are mediated by the activation by A_1 adenosine receptor.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA: adenosina deaminase

ADO: adenosina

ADP: adenosina 5'- difosfato

AK: adenosina quinase

AMP: adenosina 5' – monofosfato

AMPC: adenosina 5' – monofosfato cíclico

ATP: adenosina 5' – trifosfato

5-HT: serotonina

DA: dopamina

DAT: transportador de dopamina

GABA: ácido gama-aminobutírico

ISRS: inibidor seletivo da recaptção de serotonina

IRSN: inibidor da recaptção de serotonina-noradrenalina

NMDA: N-metil-D-aspartato

NTPDase: nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

NT: transportador de nucleosídeo

SERT: transportadores de serotonina

SNC: sistema nervoso central

TCA: antidepressivos tricíclicos

TDAH: transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

TH: tirosina hidroxilase

UDP: uridina difosfato

VMAT: transportador de monoamina vesicular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: MK-801	13
Figura 2: Peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>)	18

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	8
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Depressão	11
1.2 MK-801	13
1.3 Sistema Purinérgico	14
1.4 Sistema Dopaminérgico	17
1.5 Peixe-zebra	19
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo geral	23
3.2 Objetivos Específicos	23
CAPÍTULO 2: ARTIGO CIENTÍFICO	24
CAPÍTULO 3: CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
REFERÊNCIAS	68

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

1.1 Depressão

A depressão é uma doença multifatorial que resulta da interação de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais com episódios de humor negativo que ocorrem por mais de duas semanas (Hirschfeld, 2014). É uma doença grave, caracterizada por baixo humor, anedonia, perda de interesse em atividades diárias, e outros sintomas. Os principais sintomas da depressão são perturbações de apetite para ganho ou perda de peso, insônia ou hipersonia, concentração reduzida e agitação psicomotora (Haenisch e Bönisch, 2011). A depressão provoca um expressivo ônus pessoal e sócio-econômico, devido à prevalência de 12,8% a 15% de suicídios em pacientes com a doença (Fabbri et al., 2012). A qualidade de vida dos pacientes com diagnóstico de depressão é afetada pelo surgimento de comorbidades como: ansiedade generalizada, transtorno de estresse pós-traumático e transtorno do pânico. A associação de depressão e transtorno do pânico apresenta maior prevalência de suicídio do que em pacientes com apenas uma das doenças (IsHak et al., 2013). O diagnóstico da doença é baseado exclusivamente na observação do comportamento e das relações interpessoais relatados durante entrevista com o paciente (Haenisch et al., 2011).

O tratamento de pacientes deprimidos era, anteriormente, realizado com psicoterapia, terapia eletroconvulsiva e com fármacos antidepressivos como os inibidores da monoamino oxidase (MAO) (Haenisch et al., 2011) e os antidepressivos tricíclicos (TCA) que apresentam muitos efeitos adversos e pouca aceitação pelos pacientes (Paksereshet et al., 2012). Nas últimas décadas, o tratamento da depressão tem utilizado inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS) e inibidores da recaptação da serotonina-noradrenalina (IRSN). Os fármacos ISRS e IRSN têm como alvo o sistema serotoninérgico, pois se ligam aos SERT e NET, impedindo sua recaptação (Haenisch et al., 2011). A serotonina (5-HT) é um neurotransmissor que desempenha um papel importante em muitos comportamentos, incluindo o sono, apetite, memória, comportamento sexual e humor. A serotonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano, armazenada em vesículas pré-sinápticas e liberada para a sinapse após um potencial de ação. Uma vez na sinapse, a serotonina pode interagir com receptores serotoninérgicos, sendo

recaptada através de SERT que se ligam ao neurotransmissor liberado e levam-no através da membrana plasmática para o neurônio pré-sináptico (Sghendo et al., 2011). Os ISRS ligam-se à proteína transportadora diretamente e bloqueiam o processo de recaptação da serotonina. Conseqüentemente há um aumento nos níveis de serotonina na fenda sináptica, onde é capaz de se deslocar para receptores distantes, bem como continuar a reagir em receptores próximos. Porém, estes fármacos apresentam como desvantagens o fato de que podem levar semanas antes de mostrar os efeitos de alteração do humor, e apenas 10 a 20% dos pacientes mostram efeitos clínicos para além daqueles associados com o placebo (Zarate et al., 2013). Portanto, a necessidade de terapias de ação rápida se faz necessária. O sistema noradrenérgico modula a vigiância, a resposta ao estresse, a função neuroendócrina, o controle da dor e a atividade do sistema nervoso simpático. O neurotransmissor noradrenalina (norepinefrina) é armazenado nas vesículas neuronais e é liberado sob estímulo. O NET é uma proteína transmembrana, localizada nos terminais nervosos adrenérgicos, que é responsável pela recaptação ativa de NE liberada a partir dos neurônios pré-sinápticos (Cheng, 2008).

Atualmente, os mecanismos do glutamato na depressão têm sido considerados alvos promissores na busca de novas terapias de ação rápida. Estudos têm mostrado que uma única infusão intravenosa de cetamina, um agente anestésico antagonista do receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), pode aliviar os sintomas depressivos em pacientes dentro de horas após a administração (Berman et al., 2000). Zarrindast et al. (2012) também mostraram que o comportamento ansiolítico induzido por MK-801 afeta a locomoção, a aprendizagem e a memória. O mecanismo de ação parece ser, em parte, através da liberação de glutamato para os receptores não-NMDA, incluindo ácido alfa-Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e receptores metabotrópicos. No entanto, outras vias de sinalização, como dopaminérgico, serotoninérgico e o complexo mTORC (alvo da rapamicina em mamíferos) parecem estar envolvidos em tais efeitos (Dutta et al., 2015).

Com o objetivo de elucidar os mecanismos neurobiológicos da depressão, surge a necessidade do estabelecimento de modelos animais que reproduzam o comportamento depressivo humano e que permitam identificar alvos farmacológicos que possam representar alternativas para os tratamentos terapêuticos existentes

(Haenisch et al., 2011). O estabelecimento de um modelo animal de depressão válido não contempla os pensamentos de morte ou suicídio. Assim, modelos animais de depressão ideais devem satisfazer alguns critérios como: isomorfismo (reproduz os sintomas da doença observada em humanos), correlação farmacológica (fármacos utilizados em humanos que possam ser detectados no modelo animal) e validade (sintomas produzidos no modelo animal baseados no mesmo mecanismo neurobiológico observado em seres humanos). Os modelos animais de depressão utilizados atualmente são: estresse crônico, isolamento, residente-intruso, separação maternal, estímulos estressantes externos ou naturais (Haenisch et al., 2011).

1.2 MK-801

O MK-801 é um antagonista não-competitivo dos receptores NMDA de glutamato.

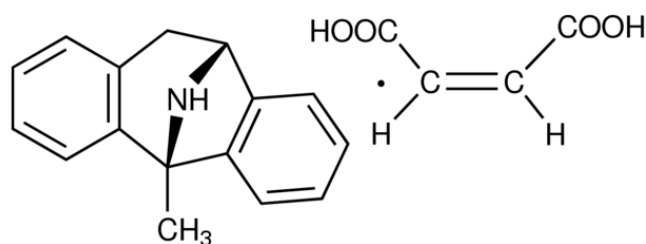


Figura 1: MK-801 (maleato de dizolcipina).

Estudos indicam que os receptores NMDA estão envolvidos na fisiopatologia da depressão e no mecanismo de ação de tratamentos antidepressivos. A análise de dados pré-clínicos e clínicos sugerem que compostos que reduzem a transmissão dos receptores NMDA exibem efeito antidepressivo, bem como anormalidades nestes receptores são observadas em pacientes com depressão (Kaster et al., 2012; Palucha et al., 2005; Poleszak et al., 2011). Desta forma, a sinalização do receptor NMDA pode ser usada como um novo alvo para o desenvolvimento de fármacos de ação antidepressiva (Ghasemi et al., 2010).

A administração de MK-801 em camundongos e peixe-zebra é também indicada como um bom modelo farmacológico para esquizofrenia (Ninan e Kulkarni, 1999; O'Neill e Shaw, 1999, Seibt et al., 2010), uma vez que em humanos esse antagonista é capaz de reproduzir tanto os efeitos positivos como os negativos da

doença (Coyle e Goff, 2003). Como sintomas positivos, podemos citar agitação (hiperlocomoção) e comportamento estereotipado (Coyle et al., 2003) e, como sintomas negativos, a diminuição da interação social (Powell e Miakawa, 2006). Diversos estudos realizados com ratos tratados com fármacos antipsicóticos têm mostrado que antipsicóticos típicos e atípicos podem reverter os sintomas positivos, negativos e o déficit cognitivo gerado pelos antagonistas NMDA (Geyer et al., 2001; Amitai et al., 2007).

Zarrindast e colaboradores mostraram que o comportamento ansiolítico induzido por MK-801 tem influência na locomoção, aprendizado e memória (Zarrindast et al., 2012). Estudos demonstraram que o uso do MK-801 em associação com fluoxetina induziu um efeito antidepressivo mais rápido e pronunciado quando comparado com o tratamento feito somente com fármacos antidepressivos (Pruus et al., 2010). Além disso, o pré-tratamento com fluvoxamina, MK-801, cetamina e a combinação de fluvoxamina com antagonistas NMDA antagonizou a depressão induzida por choque em camundongos (Chaturvedi et al., 2001).

1.3 Sistema Purinérgico

A molécula trifosfato de adenosina (ATP) foi descoberta há 80 anos. O ATP foi primeiramente identificado como um substrato energético para o metabolismo de todas as formas vivas. Entretanto, estudos mostraram que o ATP não é somente um substrato energético, mas também uma importante molécula sinalizadora, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (Burnstock, 2006). O papel do ATP como molécula sinalizadora intercelular e purinérgica foi descrito em 1972 (Burnstock, 1972). Os receptores para purinas e pirimidinas foram clonados e caracterizados, e desde então a neurotransmissão e neuromodulação do sistema purinérgico é amplamente aceita (Burnstock, 1978; Fredholm et al., 2001; Burnstock, 2008).

Os receptores purinérgicos são classificados em P1, seletivos para o nucleosídeo adenosina, ou P2, seletivos para os nucleotídeos ATP, ADP e UDP. Os receptores P1 são acoplados a proteína G; os receptores P2 se subdividem em P2X – que são acoplados a canais iônicos e P2Y – pertencentes a famílias de receptores acoplados a proteína G (la Sala et. al., 2003). Atualmente, sabe-se que os receptores P1 estão subdivididos em quatro subtipos (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3), os receptores P2X em sete subtipos ($P2X_{1-7}$) e os receptores P2Y em oito subtipos ($P2Y_1$, $P2Y_2$,

P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄) (Burnstock, 2007). A liberação do ATP para o meio extracelular pode ocorrer juntamente com outros neurotransmissores, tais como acetilcolina, serotonina, noradrenalina e GABA (Burnstock, 2004). O ATP, após ser liberado para o meio extracelular, é degradado a ADP, AMP e ADO pelas ectonucleotidasas, que desempenham um papel importante na sinalização purinérgica (Bonan et al., 2000; Robson et al., 2006). A ADO, diferente do ATP, não é considerada um neurotransmissor clássico, uma vez que não é armazenada em vesículas ou liberada por exocitose, sendo classificada como um neuromodulador (Fredholm e Dunwiddie, 1988; von Lubitz, 1999; Shen e Chen, 2009). Os níveis de adenosina extracelular são regulados através da sua produção a partir de hidrólise de AMP promovida pela ecto-5'-nucleotidase (e5NT) ou a sua degradação em inosina pela adenosina deaminase (ADA) (Bonan, 2012). A adenosina pode também ser transportada via transportadores de nucleosídeos (NTs) em processos equilibrativos bidirecionais controlados por gradientes químicos e processos de concentração unidirecionais mediados por gradientes eletroquímicos de sódio (Ipata et al, 2011; Bonan, 2012).

Dentre as ectonucleotidasas, destacam-se a família das nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases), a ecto-5'-nucleotidase e a ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP), que possuem ampla distribuição nos tecidos e são capazes de controlar os níveis de ATP, ADP, AMP e adenosina. As NTPDases são codificadas por oito genes diferentes chamados *entpd*. Quatro destas enzimas (NTPDases 1, 2, 3 e 8) estão localizadas na membrana celular com o sítio ativo voltado para o meio extracelular; duas estão localizadas intracelularmente (NTPDases 4 e 7) e duas (NTPDases 5 e 6) são excretadas de forma heteróloga após expressão intracelular (Robson et al., 2006). Estas enzimas hidrolisam tanto ATP como ADP, formando AMP na presença de íons Ca⁺² e Mg⁺² (Bigonnesse et al. 2004; Fields e Burnstock, 2006; Robson et al., 2006; Rosemberg et al., 2010b).

A ADA é encontrada no citosol e também na superfície celular como uma ectoenzima. Esta enzima está envolvida no metabolismo das purinas por catalisar a conversão da adenosina e da deoxiadenosina a inosina e deoxiinosina, respectivamente (Franco et. al., 1997). Diferentes membros da ADA, que apresentam características cinéticas distintas, já foram descritos, sendo eles ADA1 e ADA2 além de um grupo similar desta família de proteínas denominado ADAL (*adenosine deaminase-like*) (Hirschhorn e Ratech, 1980; Maier et al., 2005; Zavialov

e Engström, 2005). Todos estes membros foram classificados como subfamílias pertencentes ao grupo das adenil-desaminases. Por apresentar sítios de aminoácidos importantes relacionados à desaminação de adenosina e motivos conservados entre as subfamílias da ADA, é possível que a ADAL também realize a desaminação hidrolítica de adenosina a inosina (Maier et al., 2005).

A adenosina apresenta uma função de neuromodulador, que está envolvido na regulação de importantes mecanismos no SNC, como estados de ansiedade (El Yacoubi et al., 2000; Maximino et al., 2011), sono (Porkka-Heiskanen, 1999; Carús-Cadavieco e de Andrés, 2012), cognição e memória (Ribeiro et al., 2003; Wei et al., 2011; Shen et al., 2012), dentre outros. Estudos indicam que o sistema de sinalização adenosinérgico está também envolvido na regulação de comportamentos relacionados ao humor (Burnstock et al. 2011) e têm revelado a importância do sistema purinérgico no tratamento da depressão (Sperlagh et al., 2012). Como os receptores de adenosina A_1 e A_{2A} estão expressos no sistema límbico e tem uma profunda atividade moduladora pré- e pós-sináptica, acredita-se estarem relacionados com o efeito antidepressivo de fármacos antagonistas não seletivos (caféina) e antagonistas seletivos do receptor A_{2A} (SCH412348) (Hodgson et al., 2009). Crema et al, 2013 mostra que após teste de estresse crônico leve, o aumento do receptor A_1 e A_{2A} de adenosina no hipocampo e estriado de ratos foi vinculado com sintomas depressivos. Curiosamente, adenosina e inosina, seu metabólito, reduziram o tempo de imobilidade no teste de natação forçada e de suspensão da cauda em ratos (Kaster et al., 2004; 2013). O agonista do receptor A_1 CHA (N6-ciclohexil-adenosina) e o agonista do receptor A_{2A} DMPA (N6- [2- (3,5-dimetoxifenil) -2- (metilfenil) etil] adenosina) demonstraram um efeito antidepressivo no teste de natação forçada em ratos (Kaster et al., 2004). Curiosamente, o antagonista do receptor A_{2A} SCH 412348 teve efeitos antidepressivos semelhantes no teste de suspensão pela cauda (Hodgson et al., 2009).

1.4 Sistema Dopaminérgico

O sistema dopaminérgico regula uma grande variedade de processos fisiológicos como a atividade motora, a cognição e a memória, o humor, a aprendizagem e o sistema de recompensa (Bjorklund e Dunnett, 2007). Cerca de 80% do neurotransmissor dopamina presente no SNC encontra-se no estriado, enquanto que o restante está distribuído difusamente pelo córtex e outras regiões cerebrais (Missale et al., 1998; Iversen e Iversen, 2007).

A DA medeia funções como movimento, afeto, recompensa, cognição e emoção. Assim, este sistema de neurotransmissão está envolvido na fisiopatologia de uma variedade de distúrbios, tais como déficit de atenção e hiperatividade (TDAH), esquizofrenia ou doença de Parkinson (Haenisch et al., 2011). Os DAT são alvos farmacológicos usados para tratar o TDAH, depressão ou dependência da nicotina (Heal et al., 2009).

A síntese de dopamina é modulada pela atividade da tirosina hidroxilase (TH) que quando ativada converte o aminoácido L-tirosina em L-DOPA, que é descarboxilado para formar a dopamina (Missale et al., 1998). Uma vez sintetizada, a dopamina é armazenada em vesículas pré-sinápticas, que são transportadas para o terminal sináptico pelo transportador de monoamina vesicular (VMAT). A ação da dopamina ocorre a partir da sua liberação na fenda sináptica. A liberação de dopamina ocorre de duas formas: a liberação fásica de maior frequência e com rajadas de potencial de ação (bursts) e a liberação tônica de baixa frequência e com disparos espontâneos dos neurônios dopaminérgicos. A liberação tônica determina os níveis extracelulares deste neurotransmissor em estruturas sub corticais (Rice et al., 2011).

As ações fisiológicas mediadas pela dopamina dependem de cinco receptores distintos acoplados a proteína G: D1, D2, D3, D4 e D5. Os receptores de dopamina podem ser divididos em receptores *D₁-like* (D₁, D₅) e *D₂-like* (D₂, D₃, D₄), agrupados por suas propriedades farmacológicas e similaridade de sequência de aminoácidos. Esta classificação baseia-se geralmente na sua capacidade para modular a produção de AMPc intracelular (Beaulieu et al., 2011). Estes receptores são metabotrópicos e a ativação dos receptores de dopamina *D₁-like* estimula a proteína G_{αs}, que por sua vez ativa a adenilato ciclase, aumentando AMPc, enquanto os receptores *D₂-like* acoplados a proteína G_{αi/o}, exercem influência negativa sobre a

atividade da adenilato ciclase, diminuindo os níveis de AMPc (Missale et al, 1998). Os receptores de dopamina são bem distribuídos pelo cérebro, porém cada subtipo possui distribuição única (Saji et al., 2003). Os transportadores de dopamina (DAT) estão localizados na membrana plasmática de neurônios dopaminérgicos e são responsáveis pela rápida recaptação de dopamina (Haenisch et. al., 2011).

A interação antagônica dos receptores de adenosina e dopamina tem sido amplamente estudada na função motora e ansiedade (Coelho et al., 2014; Jenner, 2014). Evidências sugerem que a desregulação do sistema dopaminérgico está associada a uma série de patologias, tais como a Doença de Parkinson, esquizofrenia, depressão e TDAH (Missale et al, 1998; Willner et al, 2005; Papakostas et al, 2006; Iversen e Iversen, 2007; Bowton et al., 2010).

Estudo realizado com pramipexol, agonista de receptor D2/D3, demonstrou eficácia antidepressiva como tratamento adjuvante na depressão resistente. Os efeitos antidepressivos estão relacionados ao fato da dopamina estar envolvida na regulação da motivação, vontade, interesse, prazer e atenção, todos os quais estão prejudicados em pacientes deprimidos. Por isso, seria razoável supor que pacientes deprimidos que não responderam aos antidepressivos de ação serotoninérgica ou noradrenérgica podem beneficiar-se de agentes dopaminérgicos (Hori e Kunugi, 2012).

1.5 Peixe-zebra

O *Danio rerio* (Hamilton, 1822) conhecido popularmente como *zebrafish* ou paulistinha, pertence à família Cyprinidae e é um pequeno peixe teleósteo (3 – 4 cm) de água doce que vem sendo utilizado como animal de experimentação para o estudo de numerosas doenças humanas. O seu manejo, a facilidade de reprodução e de manutenção, e os métodos laboratoriais para sua criação já estão bem estabelecidos. Em geral, os peixes utilizados em pesquisa laboratorial são de pequeno porte, favorecendo um vivário pequeno e a manutenção em grupos relativamente grandes no aquário (Schneider et al., 2009).



Figura 2: Peixe zebra (*Danio rerio*). Disponível em www.zfin.org. Acessado em 20/01/2015.

O *Danio rerio* tem se mostrado bastante eficaz como modelo animal nas áreas da bioquímica, neurociências, toxicologia, biologia do comportamento, no estudo de doenças humanas e na triagem e descoberta de novos medicamentos (Seibt et al., 2009; Wong et al., 2010). Entre as vantagens deste modelo, destacam-se: baixo custo, requer pouco espaço para manutenção, rápido desenvolvimento e ciclo biológico, fácil manipulação e seu comportamento pode ser facilmente observado em um ambiente controlado (Sloman et al., 2003), além de apresentar uma grande sensibilidade a drogas e um rápido metabolismo (Goldsmith, 2004). Além disso, esta espécie apresenta um alto grau de similaridade com os genes de humanos e de camundongos (Howe et al., 2013). A elevada homologia genética com mamíferos e o desenvolvimento neural bem caracterizado permitem a utilização do peixe-zebra como modelo de estudo para doenças neuropsiquiátricas. Alguns distúrbios cerebrais complexos, incluindo TDAH, agressividade, estresse pós-traumático e abuso de substâncias têm sido estudados através deste modelo (Filby et al., 2010; Griffiths et al., 2012; Land et al., 2012; Stewart et al., 2014). Recentemente, estudos avaliando características comportamentais do peixe-zebra

foram desenvolvidos, envolvendo a análise da atividade locomotora, agressividade, interação social e aprendizado (Guo, 2004; Gerlai et al., 2000; 2009; Blank et al., 2009; Wong et al. 2010; Cognato et al., 2012).

A identificação e caracterização dos sistemas de neurotransmissão purinérgico e dopaminérgico já foram realizadas em peixe-zebra (Rico et al., 2011). Com relação ao sistema purinérgico, a presença das NTPDases (NTPDase1, NTPDase2, NTPDase3, NTPDase4, NTPDase5, NTPDase6, NTPDase8) e uma ecto-5'-nucleotidase em membranas encefálicas já foi demonstrada em peixe-zebra, (Rico et al., 2003; Senger et al., 2004; Rosemberg et al., 2010b). Além disso, a clonagem e caracterização molecular dos receptores P2X já foram realizadas (Díaz-Hernandez et al., 2002). A subunidade P2X possui nove membros, e um gene ainda precisa ser devidamente classificado (Kucenas et al., 2003). Até o momento, foram identificados apenas receptores P2Y₁ em trombócitos de peixe-zebra (Gregory e Jagadeeswaran, 2002). Estudos também identificaram os receptores de ADO do tipo A₁, A_{2A}, e A_{2B} neste teleósteo (Boehmler et al., 2009; Capiotti et al., 2011).

A existência de diferentes genes relacionados à ADA, com um padrão de expressão ubíquo em peixe-zebra já foi caracterizada (Rosemberg et al. 2007). Além disso, a cinética enzimática e as propriedades da desaminação de ADO em cérebro de peixe-zebra também já foram descritas (Rosemberg et al., 2008). A desaminação da ADO no SNC de peixe-zebra promovida por diferentes membros da família da ADA pode ser um elemento-chave para o controle da ADO/inosina no meio intracelular e extracelular (Rosemberg et al., 2008).

Já foram identificados neurônios dopaminérgicos em embriões em desenvolvimento (Holzschuh et al., 2001) e também no peixe-zebra adulto (Rink e Wullimann, 2001). Esses neurônios representam o sistema dopaminérgico ascendente para o estriado, comparado com o sistema nigroestriatal em humanos (Rink e Wullimann, 2001; 2002). Subsequentemente, os neurônios dopaminérgicos foram detectados em outras áreas do cérebro do peixe-zebra como o bulbo olfatório e a retina (Holzschuh et al., 2001). Além disso, os receptores D1, D2, D3 e D4 foram detectados e encontram-se funcionalmente expressos neste animal (Boehmler et al., 2004; Boehmler et al., 2007).

Estudos também já demonstraram o efeito do antagonismo do receptor NMDA sobre as respostas comportamentais desta espécie. O antagonismo do receptor NMDA por MK-801 aumenta a atividade natatória e prejudica a preferência por

ambiente (Swain et al., 2004). Além disso, MK-801 prejudica a memória na tarefa de esquiva inibitória (Blank et al., 2009; Seibt et al., 2011), o desempenho no labirinto em Y (Cognato et al., 2012), o aprendizado associativo (Sison e Gerlai, 2011) e a interação social (Seibt et al., 2011) em peixe-zebra. Entretanto, é importante ressaltar que a utilização de 20 μ M de MK-801 aumenta o tempo que o peixe permanece na parte superior do aquário, indicando um possível efeito antidepressivo do mesmo (Seibt et al., 2010).

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que fármacos antidepressivos disponíveis no mercado possuem início de ação lento e o grande número de recidivas da doença, faz-se necessária a busca por novos medicamentos principalmente os de ação rápida.

Os antagonistas dos receptores NMDA, como a cetamina e o MK-801, têm sido citados como uma alternativa bastante promissora como terapia de apoio aos fármacos antidepressivos existentes. Portanto, torna-se relevante aprofundar o conhecimento referente ao efeito antidepressivo induzido por antagonistas dos receptores NMDA. Neste contexto, faz-se necessário determinar os sistemas de sinalização envolvidos, mecanismos de ação, bem como informações sobre tempo do início de ação, duração do efeito e possíveis efeitos cumulativos destes compostos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antidepressivo do MK-801 e o envolvimento dos sistemas purinérgico e dopaminérgico no efeito antidepressivo promovido por este fármaco em modelo animal de depressão em peixe-zebra.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Realizar uma curva dose-resposta do efeito do MK-801 na locomoção e no tempo de permanência na parte superior do aquário;

3.2.2 Avaliar o efeito antidepressivo do MK-801 após diferentes períodos de exposição (aguda ou crônica);

3.2.3 Analisar o efeito de agonistas e antagonistas dos receptores A_1 e A_{2A} sobre o efeito antidepressivo do MK-801;

3.2.4 Analisar o efeito de inibidores da ecto-5'-nucleotidase e adenosina deaminase sobre o efeito antidepressivo do MK-801;

3.2.5 Analisar o efeito de inibidores da recaptação de adenosina sobre o efeito antidepressivo do MK-801;

3.2.6 Avaliar o efeito de antagonistas de receptores de dopamina D_1 e D_2 sobre o efeito antidepressivo do MK-801.

CAPÍTULO 2: ARTIGO CIENTÍFICO

The role of purinergic and dopaminergic systems on MK-801-induced antidepressant effects in zebrafish

Raquel Bohrer da Silva, Anna Maria Siebel, Carla Denise Bonan

Artigo submetido ao periódico *Pharmacology Biochemistry and Behavior*.

De: ees.pbb.0.2e445f.56836c8e@eesmail.elsevier.com [ees.pbb.0.2e445f.56836c8e@eesmail.elsevier.com] em nome de PBB, Elsevier [esubmissionsupport@elsevier.com]

Enviado: terça-feira, 30 de dezembro de 2014 3:44

Para: Carla Denise Bonan; carla.boli@gmail.com

Assunto: Pharmacology, Biochemistry and Behavior Submission Confirmation

Title: The role of purinergic and dopaminergic systems on MK-801-induced antidepressant effects in zebrafish

Corresponding Author: Prof. Carla Denise Bonan

Authors: Raquel B Silva; Anna M Siebel;

SI:Zebrafish Neuropharma

Dear Carla Bonan,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Pharmacology, Biochemistry and Behavior.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Pharmacology, Biochemistry and Behavior as an author:

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

Your username is: cbonan@puccs.br

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/PBB/automail_query.asp

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

Thank you for submitting your manuscript to

Pharmacology, Biochemistry and Behavior. Should you have any questions, please feel free to contact us.

Kind regards,

Elsevier Editorial System

Pharmacology, Biochemistry and Behavior

The role of purinergic and dopaminergic systems on MK-801-induced antidepressant effects in zebrafish

Raquel Bohrer da Silva^a, Anna Maria Siebel^b, Carla Denise Bonan^{a*}

^aPUCRS, Faculdade de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia. Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil.

^bPrograma de Pós-graduação em Ciências Ambientais, Universidade Comunitária da Região de Chapecó, Avenida Senador Attílio Fontana, 591E, 89809-000 Chapecó, SC, Brazil.

Corresponding author at: Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Prédio 12, Sala 301, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3353 4158; Fax: +55 51 3320 3568.

E-mail address: cbonan@pucrs.br (C.D. Bonan).

Abstract

Depression is a serious disease characterized by low mood, anhedonia, loss of interest in daily activities, appetite and sleep disturbances, reduced concentration, and psychomotor agitation. There is a growing interest in NMDA antagonists as a promising target for the development of new antidepressants. Considering that purinergic and dopaminergic systems are involved in depression and anxiety states, we characterized the role of these signaling pathways on MK-801-induced antidepressant-like effects in zebrafish. Animals treated with MK-801 at the doses of 5, 10, 15, or 20 μM during 15, 30, or 60 minutes spent longer time in the top area of aquariums in comparison to control group, indicating an anxiolytic/antidepressant-like effect induced by this drug. Animals treated with MK-801 spent longer time period at top area until 2 (5 μM MK-801) and 4 (20 μM MK-801) hours after treatment, returning to basal levels from 24 h to 7 days after exposure. Repeated MK-801 treatment did not induce cumulative effects, since animals treated daily during 7 days had the same behavioral response pattern observed since first until 7th day. In order to investigate the effects of A_1 or A_{2A} receptor antagonist and agonist and the influence of modulation of adenosine levels on MK-801 effects, we treated zebrafish with caffeine, DPCPX, CPA, ZM 241385, CGS 21680, AMPCP, EHNA, dipyridamole, and NBTI during 30 minutes before MK-801 exposure. The non-specific adenosine receptor antagonist caffeine (50 mg/kg) and the selective A_1 receptor antagonist DPCPX (15 mg/kg) prevented the behavioral changes induced by MK-801. The non-specific nucleoside transporter (NT) inhibitor dipyridamole (10 mg/kg) exacerbated the behavioral changes induced by MK-801. Dopamine receptor antagonists (Sulpiride and SCH23390) did not change the behavioral alterations induced by MK-

801. Our findings demonstrated that antidepressants-like effects of MK-801 in zebrafish are mediated through adenosine A₁ receptor activation.

Key Words: adenosine receptors, adenosine deaminase, depression, dopamine, ecto-5'-nucleotidase, MK-801, nucleoside transporters, zebrafish.

1. Introduction

Depression is a multifactorial disorder resulting from the interaction of genetic, epigenetic, and environmental episodes of negative mood that occur for more than two weeks (Hirschfeld, 2014). This is a serious disease, characterized by low mood, anhedonia, loss of interest in daily activities, and other symptoms. The main symptoms of depression are appetite disturbances to gain or weight loss, insomnia or hypersomnia, reduced concentration, and psychomotor agitation (Haenisch & Bönisch, 2011). Recently, the treatment of depression has used selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) and serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors (SNRI). However, these drugs have the drawbacks that they can take weeks before showing the effects of altered mood, and only 10-20% of patients show clinical effects beyond those associated with placebo (Zarate et al., 2013). Therefore, the need for rapid acting antidepressants is widely recognized. There is a growing interest in glutamate mechanisms in major depressive disorder (MDD) as a promising target for the development of new antidepressants. Studies have shown a single intravenous infusion of ketamine, a N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist anaesthetic agent, can alleviate depressive symptoms in patients within hours of administration (Berman et al., 2000). Zarrindast et al. (2012) also showed that the anxiolytic behavior induced by MK-801 affects locomotion, learning and memory. The mechanism of action appears to be in part through glutamate release onto non-NMDA receptors including α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) and metabotropic receptors. However, other signaling pathways such as dopaminergic, serotonergic and mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways seem to be involved in such effects (Dutta et al., 2015).

The purinergic system has been linked to the etiology of mood disorders via alterations in ATP and adenosine signaling as well as through inherited patterns and the neuroinflammatory hypothesis (for review, see Ortiz et al., 2015). It is known that adenosine signaling has a neuromodulatory role, which is involved in the regulation of important mechanisms in the CNS, such as anxiety states (Csolle et al., 2013), sleep (Huang et al., 2011; Carús-Cadavieco and de Andrés, 2012), motor function, cognition and memory (Salomone and Correa, 2009; Shen et al., 2012; Wei et al., 2011), among others. Adenosine receptors have been subdivided into four subtypes: A_1 , A_{2A} , A_{2B} , and A_3 . After chronic mild stress, the increase in A_1 and A_{2A} adenosine receptor binding in rat hippocampus and striatum was linked with depressive symptoms (Crema et al., 2013). Interestingly, adenosine and its metabolite inosine reduced immobility time in the forced swim test and tail suspension test in mice (Kaster et al., 2004; 2013). The A_1 and receptor agonist, CHA (N6-cyclohexyladenosine) and A_{2A} receptor agonists DMPA (N6-[2-(3,5-dimethoxyphenyl)-2-(methylphenyl)ethyl]adenosine) demonstrated antidepressant effects in the forced swim test in mice (Kaster et al., 2004). Interestingly, the A_{2A} receptor antagonists preladenant and SCH 412348 had similar antidepressant effects in the tail suspension test (Hodgson et al., 2009). Extracellular adenosine levels are regulated by its production from AMP hydrolysis promoted by ecto-5'-nucleotidase (e5NT) or by its degradation into inosine by adenosine deaminase (ADA) (Bonan, 2012). Studies have shown e5NT knockout mice lack non-REM sleep responses to sleep deprivation, but no changes in anxiety-like behaviors were evident in animals (Zlomuzica et al., 2013). Adenosine can also be transported via nucleoside transporters (NTs) in bidirectional equilibrative processes controlled by chemical gradients and unidirectional concentrative processes mediated by sodium

electrochemical gradients (Ipata et al., 2011; Bonan, 2012). The adenosine deaminase inhibitor EHNA (erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine) had antidepressant-like effects in the forced swim test (Kaster et al., 2013), which were inhibited by adenosine receptor antagonists.

The reciprocal antagonistic interaction of adenosine and dopamine receptors has been widely studied in motor function and anxiety (Coelho et al., 2014; Jenner, 2014). Dysfunction of the dopaminergic signaling is associated with several pathologies, such as Parkinson's disease, schizophrenia, depression, and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) (Bowton et al., 2010; Iversen & Iversen, 2007; Missale et al., 1998). The physiological actions mediated by dopamine depend on five distinct G-protein coupled receptors: D1, D2, D3, D4, and D5. Dopamine receptors can be divided into D1-like receptors (D1, D5) and D2-like (D2, D3, D4) (Beaulieu & Gainetdinov, 2011). The activation of dopamine D1-like receptors activates adenylyl cyclase and increases cAMP, while the D2-like receptors exert a negative influence on the adenylyl cyclase activity and decreases cAMP (Missale et al., 1998). Evidence has suggested that dysregulation of dopaminergic system is implicated in the pathogenesis of depression (Willner et al., 2005; Papakostas et al., 2006). An important role for dopamine D1/D5 receptor in mediating antidepressant drugs in the forced swim test (FST) (Shimazu et al., 2005) has been described whereas other studies demonstrated that dopamine D2/D3 receptor but not dopamine D1/D5 receptor antagonist blocked the effect of antidepressant in this model (Borsini et al., 1988).

Zebrafish (*Danio rerio*) has emerged as a powerful model for behavioral studies, including aggression, anxiety, learning, memory, and shoaling and been used as a model for studying several human diseases (Stewart et al., 2014; Bonan

and Norton, 2015). Furthermore, this species has a high degree of similarity with genes from humans and rodents (Howe et al., 2013). The identification and characterization of purinergic and dopaminergic neurotransmission systems have been performed in zebrafish (Rico et al., 2011; Boehmler et al., 2004, 2007, 2009; Cappiotti et al., 2011). In zebrafish, the antagonism of NMDA receptor by MK-801 increases the swimming activity and affects the preference for environment (Swain et al., 2004). In addition, MK-801 impaired memory in Y-Maze and avoidance tasks as well as induced a social interaction deficit (Cognato et al., 2012; Seibt et al., 2011). Interestingly, it is important to mention that MK-801 increases the time that the fish remained on top of the tank, indicating a possible antidepressant-like effect of MK-801 (Seibt et al., 2010).

Considering that the clinically-used antidepressant drugs are not able to provide satisfying control of depression symptoms in a large number of patients and that purinergic and dopaminergic systems are involved in depression and anxiety states, this study aims to characterize the role of signaling pathways on the MK-801-induced antidepressant-like effects.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

Adult (6-8 months old) wild-type zebrafish (*Danio rerio*) used in this study were obtained from our breeding stock held at Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. The animals were housed in a 50 L-thermostated aquarium filled with unchlorinated water constantly aerated at a targeted temperature of 26 ± 2 °C. Fish were kept under a 14–10 h light/dark cycle photoperiod and fed twice a day with

commercial flake fish food supplemented with live brine shrimp. The protocol was approved by the Ethics Committee of the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) under the number 13/00371-CEUA.

2.2 Materials

The drugs hydrogen maleate (MK-801), caffeine, dipyridamole, erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl-adenine (EHNA), 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX), cyclopentyladenosine (CPA), dipyridamole, S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosine (NBTI), CGS 21680 hydrochloride hydrate, α , β -methylene adenosine 5'-diphosphate (AMPCP), sulpiride, SCH-23390 hydrochloride and tricaine were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). ZM 241385 was purchased from Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA).

2.3 Patterning of MK-801 concentration and time treatment

In order to establish the MK-801 treatment, concentration and time treatment were determined. Zebrafish were individually exposed to MK-801 at different concentrations (5, 10, 15, or 20 μ M) by their immersion in 300 mL beakers for different exposure periods: 15, 30, and 60 min. Immediately after the MK-801 exposure, animals was individually placed in an open-field tank in order to analyze the locomotor behavior. The animals' behavior was registered by a video camera for 10 minutes and further analyzed using ANY-Maze recording software (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). Control animals were placed in tank water, treated and analyzed in an identical manner.

2.4 Duration of MK-801 treatment effects

In order to determine the duration of MK-801 effects, the behavior of treated animals was analyzed along different time-segments. Zebrafish were individually exposed to 20 μ M MK-801 for 30 minutes and had their behavior analyzed at different periods: immediately after MK-801 exposure, 1, 2, 4, 24, 48, 72, 96 hours and 7 days later. The animals' behavior in each time segment was registered by a video camera for 10 minutes and further analyzed using ANY-Maze recording software (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). Control animals were placed in tank water and were treated and analyzed in an identical manner.

2.5 MK-801 cumulative effects

In order to investigate the effects of repeated dosing, zebrafish were treated with 20 μ M MK-801 during 7 days. Zebrafish were daily exposed to 20 μ M MK-801 or tank water (control group) during 30 minutes. The animals' behavior were recorded during 10 minutes before (to verify possible changes due to adaptation to the environment) and 10 minutes after MK-801 exposure at each day. Control animals were placed in tank water and were treated and analyzed in an identical manner.

2.6 Pharmacological pretreatments and MK-801 treatment

To assess the effects of dopaminergic and adenosinergic signaling on MK-801 antidepressant-like effects, animals were pretreated with different adenosinergic and dopaminergic modulators. All drugs were injected intraperitoneally (i.p.) 30 minutes before the MK-801 20 μ M exposure. The AMPCP, Caffeine, CPA, EHNA, Sulpiride, SCH 23390 (diluted in saline), Dipyridamole, CGS 21680 hydrochloride hydrate, ZM 241385, DPCPX, NBTI (diluted in DMSO 0.08%) doses were selected based on

preliminary studies conducted in our laboratory (Table 1). Intraperitoneal injections were conducted using a 3/10-ml U-100 BD Ultra-Fine™ Short Insulin Syringe 8mm (5/16 inch)×31G Short Needle (Becton Dickinson and Company, New Jersey, USA). Anesthesia of the animals prior to the injection was obtained by its immersion in a 100 mg/L tricaine solution until the animal showed lack of motor coordination and reduced respiration rate. After the injection, the animals were placed in a separate tank with highly aerated unchlorinated tap water (26±2 °C) to facilitate their recovery from anesthesia. Thirty minutes after pretreatment injection, animals were exposed to 20 µM MK-801 during 30 minutes. Immediately after MK-801 exposure, animals were individually placed in an open-field apparatus (30 x 10 x 15 cm, length x width x height) in order to investigate their behavioral responses. The animals' behavior was registered by a video camera for 10 minutes and further analyzed using ANY-Maze recording software (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA).

2.7 Statistical analysis

The data are expressed as the mean ± S.E.M., and were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's post-hoc test. For all comparisons, the significance level was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Patterning of MK-801 treatment concentration and period

Our results have shown that MK-801 treatment induces alterations in exploratory behavior at different concentrations and exposure periods. All treatments induced an increase in time spent in the top area of the tanks (Fig 1). Animals treated

with MK-801 at the doses of 5, 10, 15, or 20 μ M during 15, 30, and 60 minutes spent longer time in the top of aquariums in comparison with control animals, indicating an anxiolytic-like or antidepressant-like effect induced by this drug.

3.2 Duration and cumulative effects of MK-801 treatment

Animals were treated with MK-801 during 30 minutes and analyzed during 10 minutes at different time segments: 1, 2, 4, 24, 48, 72, 96 hours and 7 days after the treatment. Animals treated with MK-801 spent longer time period at top area until 2 (5 μ M MK-801) and 4 (20 μ M MK-801) hours after treatment in comparison with control animals (Fig 2A). In order to evaluate possible cumulative effects induced by MK-801 treatment, animals were treated with 20 μ M MK-801 during 30 minutes once daily and had their behavior analyzed before and after each daily treatment. Our data have shown that animals treated daily with 20 μ M MK-801 showed increased preference for top area in all tests. However, MK-801 repeated treatment did not induce cumulative effects, since animals treated and analyzed once per day during 7 days showed the same behavioral response pattern observed since first until 7th day (Fig 2B).

3.3 Effects of adenosine A₁ and A_{2A} receptors antagonist and agonist on behavioral response to MK-801

In order to investigate the effects of A₁ and A_{2A} receptors antagonist and agonist on behavioral response to 20 μ M MK-801, we treated zebrafish with caffeine, DPCPX, CPA, ZM241385, and CGS21680 during 30 minutes before MK-801 exposure. Our results have shown that the non-specific adenosine receptor

antagonist caffeine (50 mg/kg) and the selective A₁receptor antagonist DPCPX (15 mg/kg) were able to prevent the anxiolytic-like behavior induced by MK-801 treatment. Animals treated with caffeine at 50 mg/kg before MK-801 treatment spent 250.6 (\pm 255.7) s at top area, while animals that were exposed to MK-801 after saline treatment spent 443.9 (\pm 250.2) s. Control animals (treated with saline and exposed to tank water) and animals treated with caffeine and exposed to tank water remained at top area during 215.2 (\pm 154.8) and 96.96 (\pm 71.5) s, respectively (Fig 3A; F (3,64)=8.44).

Animals treated with DPCPX at 15 mg/kg before MK-801 treatment spent 222.42 (\pm 203.06) s at top area, while animals that were exposed to MK-801 after DMSO treatment spent 415.56 (\pm 218.5) s. Control animals (treated with DMSO and exposed to tank water) and animals treated with DPCPX and exposed to tank water remained at top area during 127.17 (\pm 127.1) and 131.94 (\pm 122.2) s, respectively (Fig 3B; F (3,106) =16.14).

The selective adenosine A₁ agonist CPA and both the adenosine A_{2A} receptor antagonist ZM 241385 and agonist CGS 21680 were not able to change behavioral responses induced by MK-801 treatment (Fig. 3C; F (3,64) = 7.74. Fig 3D; F (3,48) = 11.82. Fig 3E; F (3,48) = 13.34).

Finally, we analyzed the preference for top or bottom of tanks in time segments of 30 seconds and observed that behavioral pattern of each group was the same in all time segments (Fig 4). Our findings have shown that behavioral changes induced by MK-801 exposure and the different drug pretreatments were evident from the beginning until the end of analyses period.

3.4 Effects of modulation of extracellular adenosine levels on behavioral response to MK-801

In order to investigate the effects of modulation of adenosine levels on behavioral response to 20 μ M MK-801, we treated zebrafish with AMPCP, EHNA, dipyridamole, and NBTI during 30 minutes before MK-801 exposure. Our results have shown that the adenosine reuptake inhibition by the non-specific nucleoside transporter (NT) inhibitor dipyridamole (10 mg/kg) was able to exacerbate the behavioral changes induced by MK-801 treatment.

Animals treated with dipyridamole at 10 mg/kg before MK-801 treatment spent 557.4 (\pm 129.9) s at top area, while animals that were exposed to MK-801 after DMSO treatment spend 397.0 (\pm 221.2) s. Control animals (treated with DMSO and exposed to tank water) and animals treated with dipyridamole and exposed to tank water remained at top area during 105.7 (\pm 51.3) and 148.9 (\pm 66.5) s, respectively (Fig 5C; $F(3,44) = 29.35$).

The inhibition of nucleotide hydrolysis by the ecto-5'-nucleotidase inhibitor AMPCP, the inhibition of adenosine deaminase by the ADA inhibitor EHNA and the adenosine reuptake inhibition by the inhibitor of equilibrative nucleoside transporters (ENTs) NBTI were not able to change MK-801 behavioral responses (Fig 5A; $F(3, 60) = 14.35$, Fig 5B; $F(3,64) = 9.18$, Fig 5D; $F(3,60) = 17.56$).

In addition, our results have shown that behavioral changes induced by MK-801 exposure and the different drug pretreatments were evident from the beginning until the end of analyses period. We analyzed the preference for top or bottom of tanks in time segments of 30 seconds and observed that behavioral pattern of each group was the same in all time segments (Fig 6).

3.5 Effects of modulation of dopamine receptor antagonists on behavioral response to MK-801

In order to investigate the effects of dopamine receptors on behavioral response to 20 μ M MK-801, we treated zebrafish with dopamine D2/D3 receptor antagonist sulpiride (50 mg/kg) and dopamine D1-like receptor antagonist SCH23390 (15 μ g/kg). Our results have shown that these dopamine receptor antagonists were not able to change the behavioral responses induced by MK-801 exposure (Fig 7A; $F(3,64) = 6.47$, Fig 7B; $F(3,64) = 6.97$). Our studies have shown that the different treatments induced a similar behavioral pattern in all time segments analyzed (Fig 7C, D).

4. Discussion

In this study, our findings showed that MK-801 induced a preference for the top area of the tank, suggesting an antidepressant-like effect. The pretreatment with the non-selective adenosine receptor antagonist caffeine and with the selective adenosine A₁receptor antagonist DPCPX prevented the preference for the top of the tank. However, our results demonstrated that non-specific nucleoside transporter (NT) inhibitor dipyridamole exacerbated the behavioral response induced by MK-801.

Depression is a psychiatric disorder that affects millions of people worldwide and is estimated that will be the second largest cause of death by the year 2020. Depressed patients present increased risk of cardiovascular events and suicide (Fabbri et al., 2013; Zarate et al, 2013). In addition, currently available traditional medicines (SSRI and SNRI) are not absolutely effective, in view of the fact that depressed patients treated with these drugs often have relapses and persistent symptoms (Ates-Alagoz & Adejare, 2013).

Different studies have shown that neurological and psychiatric disorders, such as Alzheimer's disease, epilepsy, chronic pain, schizophrenia, Parkinson's disease, anxiety and major depressive disorders are developed from disturbances in NMDA signaling (Ates-Alagoz & Adejare, 2013; Kaster et al., 2012). NMDA receptor antagonists induced antidepressant-like effects in different animal models (Ates-Alagoz & Adejare, 2013). MK-801 is a noncompetitive NMDA receptor antagonist and its antidepressant properties have been evaluated through different behavioral studies (Ates-Alagoz & Adejare, 2013). Evidence has shown that MK-801 provoked anxiolytic effects, which induced changes on mobility, learning, and memory (Zarrindast et al., 2012). Seibt et al. (2010) observed that 20 μ M MK-801 exposure during 30 and 60 minutes promoted anxiolytic effects in zebrafish. Therefore, it appears that NMDA receptor antagonists may be useful for the development of a new generation of improved treatments for depression. In agreement, our findings have shown that MK-801 treatment induces antidepressant-like effects, in view of the fact that animals treated with MK-801 spent longer period on the top area of the tank.

To determine the range of concentrations of MK-801 and the time treatment able to promote the antidepressant-like effect expected, concentration and time courses were carried out. The results demonstrated that all tested concentrations (5, 10, 15, and 20 μ M) in the different exposure times (15, 30 and 60 minutes) showed significant behavioral differences in relation to control group. These data are consistent with the data presented in previous studies which demonstrate that acute exposure to MK-801 induces anxiolytic behavior, increased movement, and preference for the top area of the aquarium (Zarrindast et al, 2012; Seibt et al., 2010).

In order to analyze the duration of the antidepressant-like effect of MK-801, animals were exposed for 30 minutes to the lowest (5 μ M) and highest (20 μ M) concentrations tested in the previous experiment. It has been observed that animals exposed to 5 μ M MK-801 for 30 min spent longer period in the top of the tank up to 2 hours after exposure. However, the animals exposed to 20 μ M MK-801 presented behavioral alterations until 4 hours after exposure and returned to control levels from 24 hours to 7 days later the exposure. Our results have also shown that this effect is not changed by repeated exposure. Animals exposed to 20 μ M MK-801 during 30 minutes once time daily during 7 consecutive days showed behavioral response pattern that was similar from the first until 7th day. The treated and control groups were analyzed before each daily exposure in order to exclude possible behavioral changes induced by an adaptive behavior to the environment. The results showed that animals remained on top of the aquarium only immediately after exposure, showing behavioral pattern similar to control group on the subsequent day. Therefore, these results suggest that MK-801 presents a rapid and not cumulative antidepressant-like effect. The acute effect observed is in agreement with previous studies that investigated other noncompetitive NMDA receptor antagonists. Duman (2014) reports that NMDA antagonists block the tonic firing of GABAergic interneurons, reinforcing the idea that glutamate burst promote results from disinhibition of glutamate terminals (Homayoun and Moghaddam, 2007). Therefore, studies indicate that agents that increase glutamate release or act directly on postsynaptic AMPA receptors may also have rapid-acting antidepressant effects (Maeng et al., 2008).

Adenosine gained attention by modulation of dopaminergic and glutamatergic transmission in mood disorders (Hirota & Kishi, 2013). Studies show that adenosine

A₁ receptors decreased glutamate release attenuating the motor impulsivity (Marek, 2012). Considering that adenosine signaling modulates normal and pathological behaviors and is involved in mood and motivation, we investigated the influence of adenosine receptors and the modulation of adenosine levels on antidepressant effects induced by MK-801. We analyzed the influence of the adenosine receptors antagonist caffeine, A₁ receptor antagonist DPCPX, A₁ receptor agonist CPA, A_{2A} receptor antagonist ZM 241385, and A_{2A} receptor agonist CGS 21680. In addition, the modulation of adenosine levels was investigated through pretreatment with the ecto-5' nucleotidase inhibitor AMPCP, ADA inhibitor EHNA, non-specific NT inhibitor dipyridamole and equilibrative NT inhibitor NBTI. Our data showed that pretreatment with the nonspecific adenosine antagonist caffeine inhibited MK-801-induced antidepressant-like effects. Caffeine stimulates motor activity, modulates the sleep onset and quality, and improves attention and memory (Cunha and Agostinho, 2010; Rivera-Oliver and Díaz-Ríos, 2014). The pharmacological action of caffeine is primarily through a non-selective adenosine receptor antagonism with A₁ and A_{2A} receptors as preferential targets. Evidence indicates that caffeine enhances the release of GABA by inactivating the A₁ receptor (Ferreira et al., 2014). Da Silva et al. (2005) demonstrated that blockade of A₁ receptor by caffeine reduced the locomotor effect induced by MK-801 by decreasing the release of GABA. Our results showed that DPCPX, a selective A₁ receptor antagonist, promoted a similar effect to that observed to caffeine, preventing MK-801 antidepressant-like effects. In addition, our data demonstrate that there is no involvement of A_{2A} receptors in the antidepressant-like effect of MK-801. Therefore, our results indicate that MK-801 effects are dependent on activation of A₁ adenosine receptors, which could reduce GABAergic neurotransmission and contribute to MK-801 antidepressant-like effects.

The modulation of extracellular adenosine levels is promoted by the action of ecto-5'-nucleotidase and adenosine deaminase, enzymes responsible for production and degradation of adenosine, respectively. Other important mechanism to control extracellular adenosine levels involves the action of NTs. Dipyridamole inhibits adenosine uptake, increasing the bioavailability of adenosine in the synaptic cleft and potentiating its effect (Kulkarni and Mehta, 1985). Lobato et al. (2008) demonstrated dipyridamole potentiates the antidepressant effect induced by zinc. In agreement, we observed that the non-specific NT inhibitor dipyridamole exacerbates MK-801-induced antidepressant-like effects, possibly due to an increase in extracellular adenosine levels promoted by NT inhibition, potentiating its activity.

The interaction of glutamatergic and dopaminergic pathways is involved in the modulation of anxiety-related behaviors. Zarrindast et al (2012) showed MK-801 administration induced anxiolytic-like behaviors, which were potentiated by dopamine D1 receptor antagonist (SCH23390) and blocked by dopamine D2 receptor antagonist (sulpiride). These authors did not observe changes in locomotor activity and defecation, indicating the applied doses do not seem to affect anxiety-related behaviors. Some studies have shown that the increase in locomotor activity as induced by NMDA receptor antagonists may be linked to the increased synthesis, release, and metabolism of dopamine in various brain regions. Our results showed pretreatment D1 and D2/D3 receptor antagonists did not alter the behavioral responses induced by MK-801. These data demonstrated that the antidepressant-like effect induced by MK-801 in zebrafish is not directly related to the dopaminergic system.

In summary, our results demonstrated that antidepressant-like effects of MK-801 in zebrafish are promoted mainly through adenosine A₁ receptor activation. In

addition, our findings indicate that the A_{2A} receptors, nucleoside-metabolizing enzymes and dopaminergic signaling are not directly involved in the antidepressant-like effect induced by MK-801 in zebrafish.

5. 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 — PRONEX). C.D.B is Research Career Awardees of the CNPq. A.M.S was the recipient of a fellowship from CAPES.

6. References

- Ates-Alagoz Z, Adejare, A. NMDA Receptor Antagonists for Treatment of Depression. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 2013; 6(4), 480–99. doi:10.3390/ph6040480
- Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 2011; 63: 182-217.
- Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*. 2000;47(4):351-4.
- Boehmler W, Carr T, Thisse C, Thisse B, Canfield VA, Levenson R. D4 dopamine receptor genes of *zebrafish* and effects of the antipsychotic clozapine on larval swimming behavior. *Genes Brain Behav* 2007; 6: 155-166.
- Boehmler W, Obrecht-Pflumio S, Canfield V, Thisse C, Thisse B, Levenson R. Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in *zebrafish*. *Dev Dyn*.2004; 230: 481-493.
- Boehmler W, Petko J, Woll M, Frey C, Thisse B, Thisse C, Canfield VA, Levenson R. Identification of *zebrafish* A2 adenosine receptors and expression in developing embryos. *Gene Expr Patterns* 2009; 9(3):144-51.
- Bonan CD. Ectonucleotidases and nucleotide/nucleoside transporters as pharmacological targets for neurological disorders. *CNS NeurolDisord Drug Targets* 2012; 11: 739-750.
- Bonan CD, Norton WH. The utility of zebrafish as a model for behavioural genetics. *Curr Op BehavSci* 2015; 2:34-38.
- Borsini F, Lecci A, Mancinelli A, D'Aranno V, Meli A. Stimulation of dopamine D-2 but not D-1 receptors reduces immobility time of rats in the forced swimming test: implication for antidepressant activity. *Eur J Pharmacol*. 1988;148(3):301-7.
- Bortolotto JW, de Melo GM, de Paula Cognato G, Vianna MR, Bonan CD. Modulation of adenosine signaling prevents scopolamine-induced cognitive impairment in zebrafish. *Neurobiol Learn Mem*. 2014 Dec 6.pii: S1074-7427(14)00214-7. doi: 10.1016/j.nlm.2014.11.016.
- Bowton E, Saunders C, Erreger K, Sakrikar D, Matthies HJ, Sen N, Jessen T, Colbran RJ, Caron MG, Javitch JA, Blakely RD, Galli A. Dysregulation of

dopamine transporters via dopamine D2 autoreceptors triggers anomalous dopamine efflux associated with attention-deficit hyperactivity disorder. *J Neurosci*. 2010; 30: 6048-6057.

Capiotti KM, Menezes FP, Nazario LR, Pohlmann JB, de Oliveira GM, Fazenda L, Bogo MR, Bonan CD, Da Silva RS. Early exposure to caffeine affects gene expression of adenosine receptors, DARPP-32 and BDNF without affecting sensibility and morphology of developing *zebrafish* (*Danio rerio*). *Neurotoxicol Teratol*. 2011; 33: 680-685.

Carús-Cadavieco M, de Andrés I. Adenosina y control homeostático del sueño. Acciones en estructuras diana de los circuitos de vigilia y sueño. *Rev Neurol*. 2012; 55: 413-420.

Coelho JE, Alves P, Canas PM, Valadas JS, Shmidt T, Batalha VL, Ferreira DG, Ribeiro JA, Bader M, Cunha RA, do Couto FS, Lopes LV. Overexpression of Adenosine A2A Receptors in Rats: Effects on Depression, Locomotion, and Anxiety. *Front Psychiatry*. 2014; 5:67. doi: 10.3389/fpsy.2014.00067.

Cognato GP, Bortolotto JW, Blazina AR, Christoff RR, Lara DR, Vianna MR, Bonan CD. Y-Maze memory task in *zebrafish* (*Danio rerio*): The role of glutamatergic and cholinergic systems on the acquisition and consolidation periods. *Neurobiol Learn Mem*. 2012; 98: 321-328.

Crema LM, Pettenuzzo LF, Schlabitz M, Diehl L, Hoppe J, Mestriner R, Laureano D, Salbego C, Dalmaz C, Vendite D. The effect of unpredictable chronic mild stress on depressive-like behavior and on hippocampal A1 and striatal A2A adenosine receptors. *Physiol Behav* 2013;109:1-7. doi: 10.1016/j.physbeh.2012.11.001.

Csölle C, Baranyi M, Zsilla G, Kittel A, Gölöncsér F, Illes P, Papp E, Vizi ES, Sperlág B. Neurochemical Changes in the Mouse Hippocampus Underlying the Antidepressant Effect of Genetic Deletion of P2X7 Receptors. *PLoS One*. 2013;8(6):e66547.

Cunha RA, Agostinho PM. Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. *J Alzheimers Dis* 2010;20 Suppl 1:S95-116. doi: 10.3233/JAD-2010-1408.

Da Silva RS, Hoffman A, de Souza DO, Lara DR, Bonan CD. Maternal caffeine intake impairs MK-801-induced hyperlocomotion in young rats. *Eur J Pharmacol* 2005, 509(2-3): 155–9. doi:10.1016/j.ejphar.2005.01.001

- Duman RS. Pathophysiology of depression and innovative treatments: remodeling glutamatergic synaptic connections. *Dialogues Clin Neurosci*. 2014;16(1):11-27.
- Dutta A, McKie S, Deakin JF. Ketamine and other potential glutamate antidepressants. *Psychiatry Res*. 2015;225(1-2):1-13.
- Fabbri C, Girolamo G, Serretti A. Pharmacogenetics of Antidepressant Drugs: An Update After Almost 20 Years of Research. *Am J Med Genet Part B* 2012; 9999:1–34.
- Ferreira DP, Stutz B, de Mello FG, Reis R a M, Kubrusly RCC. Caffeine potentiates the release of GABA mediated by NMDA receptor activation: Involvement of A1 adenosine receptors. *Neuroscience* 2014, 281C: 208–215. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.09.060
- Haenisch B, Bonisch. Depression and antidepressants: Insights from knockout of dopamine, serotonin or noradrenaline re-uptake transporters. *PharmacolTherap* 2011; 1290: 352–368.
- Hirota T, Kishi T. Adenosine hypothesis in schizophrenia and bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trial of adjuvant purinergic modulators. *Schizophrenia Res* 2013;149(1-3): 88–95. doi:10.1016/j.schres.2013.06.038
- Hirschfeld RM. Differential diagnosis of bipolar disorder and major depressive disorder. *J Affect Disord*. 2014 Dec;169S1:S12-S16.
- Hodgson RA, Bertorelli R, Varty GB, Lachowicz JE, Forlani A, Fredduzzi S, Cohen-Williams ME, Higgins GA, Impagnatiello F, Nicolussi E, Parra LE, Foster C, Zhai Y, Neustadt BR, Stamford AW, Parker EM, Reggiani A, Hunter JC. Characterization of the potent and highly selective A2A receptor antagonists preladenant and SCH 412348 [7-[2-[4-(2,4-difluorophenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-2-(2-furanyl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amine] in rodent models of movement disorders and depression. *J PharmacolExpTher*. 2009; 330(1):294-303.
- Homayoun H, Moghaddam B. NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J Neurosci*. 2007;27(43):11496-500.
- Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013;496(7446):498-503.

- Huang ZL, Urade Y, Hayaishi O. The role of adenosine in the regulation of sleep. *Curr Top Med Chem*. 2011;11(8):1047-57.
- Ipata PL, Camici M, Micheli V, Tozz MG. Metabolic network of nucleosides in the brain. *Curr Top Med Chem* 2011; 11: 909-922.
- Iversen SD, Iversen LL. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci*.2007; 30: 188-193.
- Jenner P. An overview of adenosine A2A receptor antagonists in Parkinson's disease. *IntRevNeurobiol*. 2014;119:71-86. doi:10.1016/B978-0-12-801022-8.00003-9.
- Kaster MP, Budni J, Gazal M, Cunha MP, Santos AR, Rodrigues AL. The antidepressant-like effect of inosine in the FST is associated with both adenosine A1 and A2A receptors. *Purinergic Signal*. 2013;9(3):481-6. doi:10.1007/s11302-013-9361-8.
- Kaster MP, Machado DG, Santos ARS, Rodrigues AL. Involvement of NMDA receptors in the antidepressant-like action of adenosine. *Pharmacol Rep* 2012; 64, 706-713.
- Kaster MP, Rosa AO, Rosso MM, Goulart EC, Santos AR, Rodrigues AL. Adenosine administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of A1 and A2A receptors. *NeurosciLett*. 2004;355(1-2):21-4.
- Kulkarni SK, Mehta AK. Purine nucleoside--mediated immobility in mice: reversal by antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)*. 1985;85(4):460-3.
- Lobato KR, Binfaré RW, Budni J, Rosa AO, Santos ARS, Rodrigues ALS. Involvement of the adenosine A1 and A2A receptors in the antidepressant-like effect of zinc in the forced swimming test. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2008;32(4): 994–9. doi:10.1016/j.pnpbp.2008.01.012
- Maeng S, Zarate CA Jr, Du J, Schloesser RJ, McCammon J, Chen G, Manji HK. Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. *Biol Psychiatry*. 2008;63(4):349-52.
- Marek GJ. Activation of adenosine₁ receptors induces antidepressant-like, anti-impulsive effects on differential reinforcement of low-rate 72-s behavior in rats. *J PharmacolExpTher*. 2012;341(2):564-70. doi: 10.1124/jpet.112.191718.

- Mareš P. Anticonvulsant action of 2-chloroadenosine against pentetrazol-induced seizures in immature rats is due to activation of A1 adenosine receptors. *J Neural Transm.* 2010;117(11):1269-77. doi: 10.1007/s00702-010-0465-9
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 1998; 78: 189-225.
- Ortiz R, Ulrich H, Zarate CA Jr, Machado-Vieira R. Purinergic system dysfunction in mood disorders: a key target for developing improved therapeutics. *ProgNeuropsychopharmacolBiol Psychiatry* 2015;57C:117-131. doi: 10.1016/j.pnpbp.2014.10.016.
- Papakostas GI. Dopaminergic-based pharmacotherapies for depression. *EurNeuropsychopharmacol.* 2006;16(6):391-402.
- Rico EP, Rosemberg DB, Seibt KJ, Capiotti KM, Da Silva RS, Bonan CD. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *NeurotoxicolTeratol.* 2011; 33: 608-617.
- Rivera-Oliver M, Díaz-Ríos M. Using caffeine and other adenosine receptor antagonists and agonists as therapeutic tools against neurodegenerative diseases:a review. *Life Sci.* 2014;101(1-2):1-9. doi: 10.1016/j.lfs.2014.01.083.
- Salamone JD, Correa M. Dopamine/adenosine interactions involved in effort-related aspects of food motivation. *Appetite.* 2009;53(3):422-5. doi: 10.1016/j.appet.2009.07.018.
- Seibt KJ, Oliveira RL, Rico EP, Bonan CD et. al. Antipsychotic drugs prevent the motor hyperactivity induced by psychotomimetic MK-801 in *zebrafish* (*Daniorerio*). *BehavIBrain Res.* 2010; 214:417 – 422.
- Seibt KJ, Piato AL, da Luz Oliveira R, Capiotti KM, Vianna MR, Bonan CD. Antipsychotic drugs reverse MK-801-induced cognitive and social interaction deficits in *zebrafish* (*Daniorerio*). *Behav Brain Res.* 2011; 224(1):135-9.
- Shen HY, Singer P, Lytle N, Wei CJ, Lan JQ, Williams-Karnesky RL, Chen JF, Yee BK, Boison D. Adenosine augmentation ameliorates psychotic and cognitive endophenotypes of schizophrenia. *J Clin Invest.* 2012; 122: 2567-2577.
- Shimazu S, Minami A, Kusumoto H, Yoneda F. Antidepressant-like effects of selegiline in the forced swim test. *EurNeuropsychopharmacol.* 2005;15(5):563-71.

- Siebel AM, Menezes FP, Capiotti KM, Kist KW, Schaefer IC, Frantz JZ, Bogo MR, Da Silva, RS, Bonan, CD. Role of Adenosine Signaling on Pentylentetrazole-Induced Seizures in Zebrafish. *Zebrafish*, 2015 in press.
- Southam E, Stratton SC, Sargent RS, Brackenborough KT, Duffy C, Hagan RM, Pratt GD, Jones SA, Morgan PF. Broad spectrum anticonvulsant activity of BW534U87: possible role of an adenosine-dependent mechanism. *PharmacolBiochemBehav*. 2002;74(1):111-8.
- Stewart AM, Braubach O, Spitsbergen J, Gerlai R, Kalueff AV. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *Trends Neurosci*.2014; 37(5):264-78. doi: 10.1016/j.tins.2014.02.011.
- Swain HA, Sigstad C, Scalzo FM. Effects of dizocilpine (MK-801) on circling behavior, swimming activity, and place preference in *zebrafish* (*Daniorerio*).*NeurotoxicolTeratol*. 2004; 26(6):725-9.
- Wei CJ, Singer P, Coelho J, Boison D, Feldon J, Yee BK, Chen JF. Selective inactivation of adenosine A(2A) receptors in striatal neurons enhances working memory and reversal learning. *Learn Mem*. 2011; 18: 459-474.
- Willner P, Hale AS, Argyropoulos S. Dopaminergic mechanism of antidepressant action in depressed patients. *J Affect Disord*. 2005;86(1):37-45.
- Zarate C, Duman RS, Liu G, Sartori S, Quiroz J, Murck H. New paradigms for treatment-resistant depression. *Ann N Y Acad Sci*. 2013: 1292(1):21-3.
- Zarrindast MR, Nasehi M, Pournaghshband M, Yekta BG. Dopaminergic system in CA1 modulates MK-801 induced anxiolytic-like responses. *PharmacolBiochemBehav* 2012; 103:102–110.
- Zlomuzica A, Burghoff S, Schrader J, Dere E. Superior working memory and behavioural habituation but diminished psychomotor coordination in mice lacking the ecto-5'-nucleotidase (CD73) gene. *Purinergic Signal*. 2013;9(2):175-82.doi: 10.1007/s11302-012-9344-1.

Figure Legends

Figure 1: Time and dose course of MK-801-induced behavioral response in zebrafish. Animals were exposed to MK-801 at 5, 10, 15, and 20 μ M during 15, 30, and 60 minutes. MK-801-induced behavioral response was measured as time spent in top area of the tank. The data are expressed as the mean \pm S.E.M. (n=16 per group), and were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test. The symbols represent statistical difference when compared to the respective vehicle control group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$.

Figure 2: MK-801-induced behavioral response in zebrafish. MK-801-induced behavioral response was measured as time spent in top area of the tank. (A) Duration of MK-801 action in zebrafish. Animals were exposed to MK-801 at 5 and 20 μ M during 30 minutes. Behavioral parameters were analysed in different time segments: immediately after and, 1, 2, 4, 24, 48, 72, 96 hours and 7 days after treatment. (B) Effects of repeated doses of MK-801 in zebrafish. Animals were daily exposed to MK-801 at 20 μ M during 30 minutes. Behavioral parameters were analysed before and after MK-801 exposure. The data are expressed as the mean \pm S.E.M. (n=16 per group), and were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test. The symbols represent statistical difference when compared to the respective vehicle control group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$.

Figure 3: Effects of caffeine (A), DPCPX (B), CPA (C), ZM 241385 (D), and CGS 21680 (E) pretreatments on MK-801-induced behavioral alterations in zebrafish. Animals were exposed to 20 μ M MK-801 (during 30 minutes) immediately after pretreatments administration. Behavioral response was measured as time spent in top area o the tank during 10 minutes. The data are expressed as the mean \pm S.E.M. (n=16-26 per group), and were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test. The symbol * represents statistical difference when compared to the respective vehicle control group. The symbol # represents statistical difference when compared to the respective vehicle control group. * P<0.05, ** P<0.005, *** P<0.0005, # P<0.05, ### P<0.0005.

Figure 4: Effects of caffeine (A), DPCPX (B), CPA (C), ZM241385 (D), and CGS21680 (E) pretreatments on MK-801-induced behavioral alterations in zebrafish. Animals were exposed to 20 μ M MK-801 (during 30 minutes) immediately after pretreatments administration. The behavioral response was measured as time spent in top area o the tank for each 60 seconds. The data are expressed as the mean \pm S.E.M. (n=16-26 per group), and were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test.

Figure 5: Effects of AMPCP (A), EHNA (B), Dipyrindamole (C), and NBTI (D) pretreatments on MK-801-induced behavioral alterations in zebrafish. Animals were exposed to 20 μ M MK-801 (during 30 minutes) immediately after pretreatments administration. The behavioral response was measured as time spent in top area o the tank during 10 minutes. The data are expressed as the mean \pm S.E.M. (n=11 per group), and were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc

test. The symbol * represents statistical difference when compared to the respective vehicle control group. The symbol # represents statistical difference when compared to the respective vehicle control group. ** P<0.005, *** P<0.0005. # P<0.05.

Figure 6: Effects of AMPCP (A), EHNA (B), Dipyridamole (C), and NBTI (D) pretreatments on MK-801-induced behavioral alterations in zebrafish. Animals were exposed to 20 μ M MK-801 (during 30 minutes) immediately after pretreatments administration. The behavioral response was measured as time spent in top area of the tank for each 60 seconds. The data are expressed as the mean \pm S.E.M (n=11 per group), and were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test.

Figure 7: Effects of Sulpiride (A,C), and SCH23390 (B,D) pretreatments on MK-801-induced behavioral alterations in zebrafish. Animals were exposed to 20 μ M MK-801 (during 30 minutes) immediately after pretreatments administration. The behavioral response was measured as time spent in top area of the tank during 10 minutes (A,B) and for each 60 seconds (C,D). The data are expressed as the mean \pm S.E.M. (n=16 per group), and were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test.

Table 1: Pretreatments with adenosinergic and dopaminergic drugs on MK-801 antidepressant effects

Drug	Doses	Vehicle	Reference
DPCPX	15 mg/kg	DMSO 0.08%	Southam et al., 2002
CPA	1 mg/kg	Saline	Mares, 2010
ZM 241385	10 µg/kg	DMSO 0.08%	Mares, 2010
CGS 21680	1 mg/kg	DMSO 0.08%	Mares, 2010 ²
EHNA	100 µg/kg	Saline	Southam et al., 2002
AMPCP	100 mg/kg	Saline	Siebel et al., 2015
Caffeine	50 mg/kg	Saline	Bortolotto et al., 2015
Dipyridamole	10mg/kg	DMSO 0.08%	Siebel et al., 2015
NBTI	15 mg/kg	DMSO 0.08%	Siebel et al., 2015
Sulpiride	50 mg/kg	Saline	Zarrindast et al., 2012
SCH23390	15 µg/kg	Saline	Zarrindast et al., 2012

Figure 1

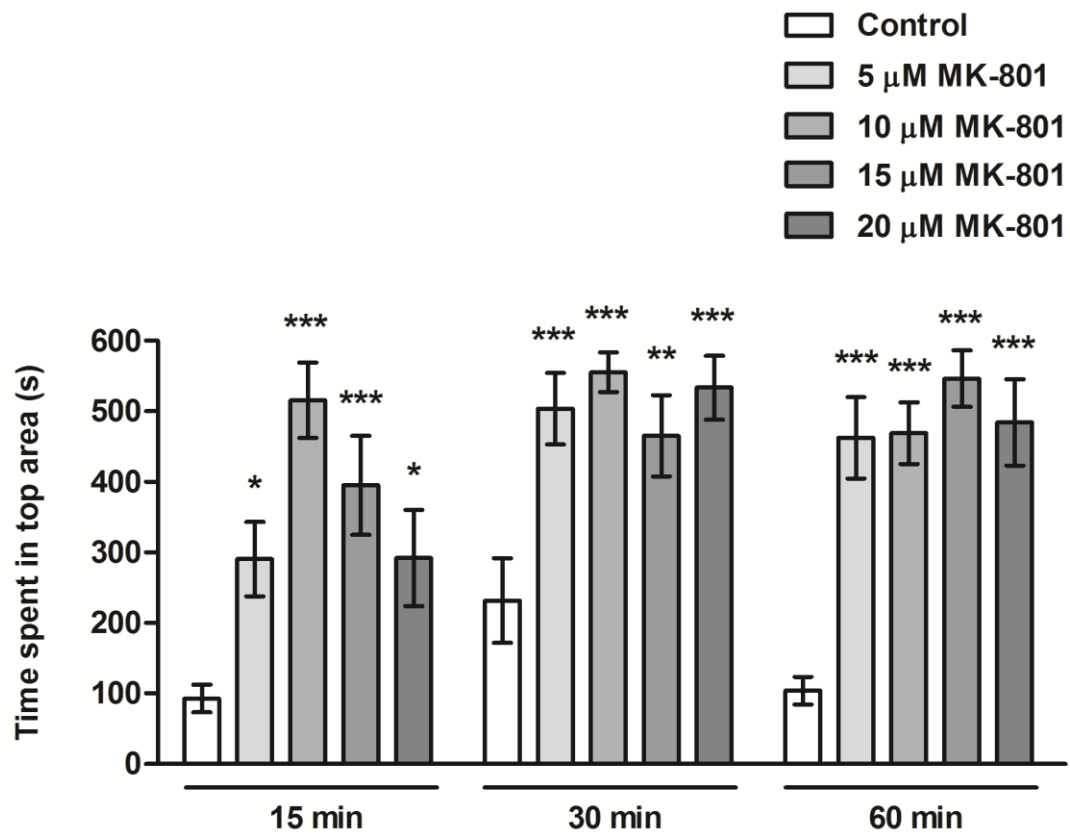


Figure 2

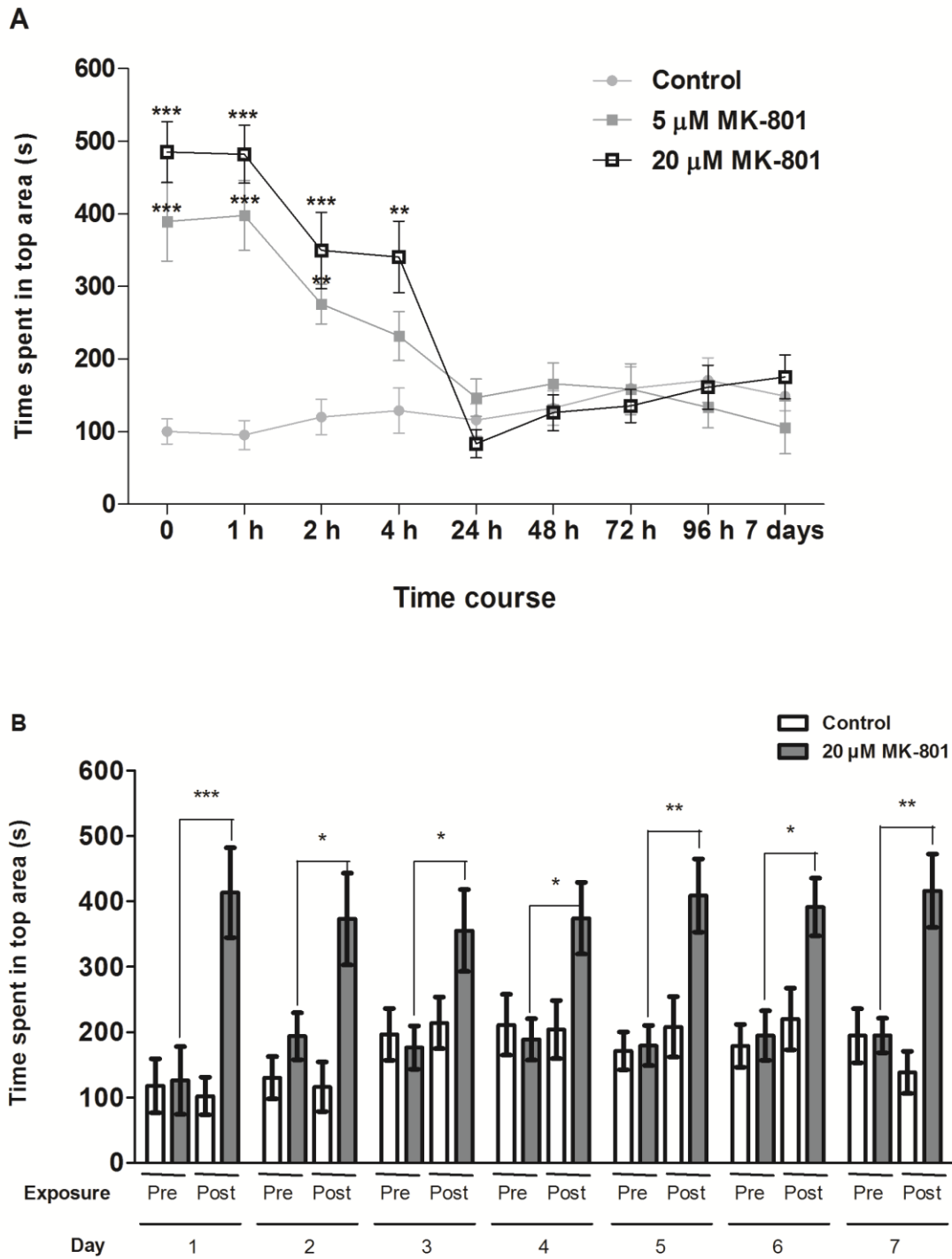


Figure 3

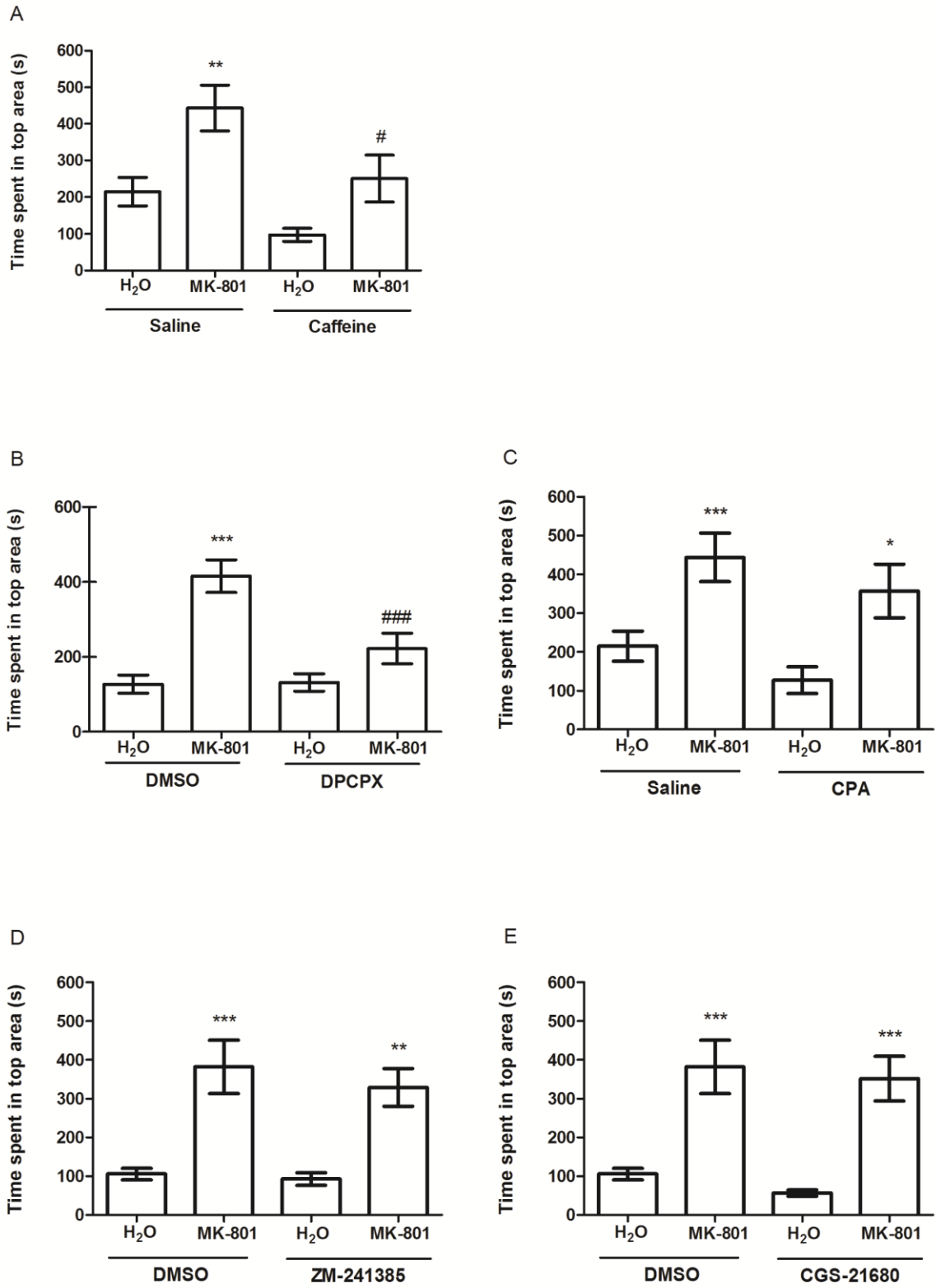


Figure 4

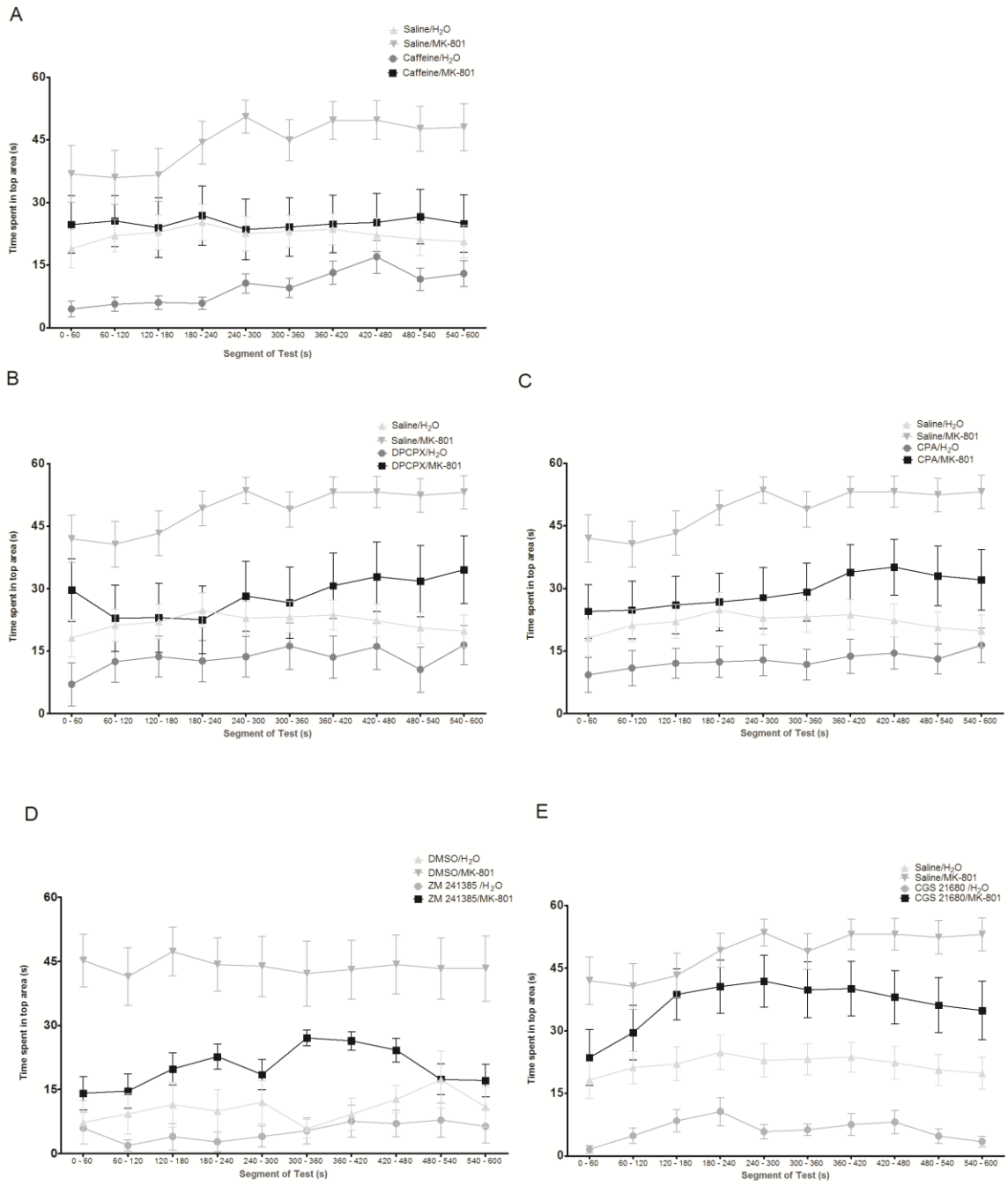


Figure 5

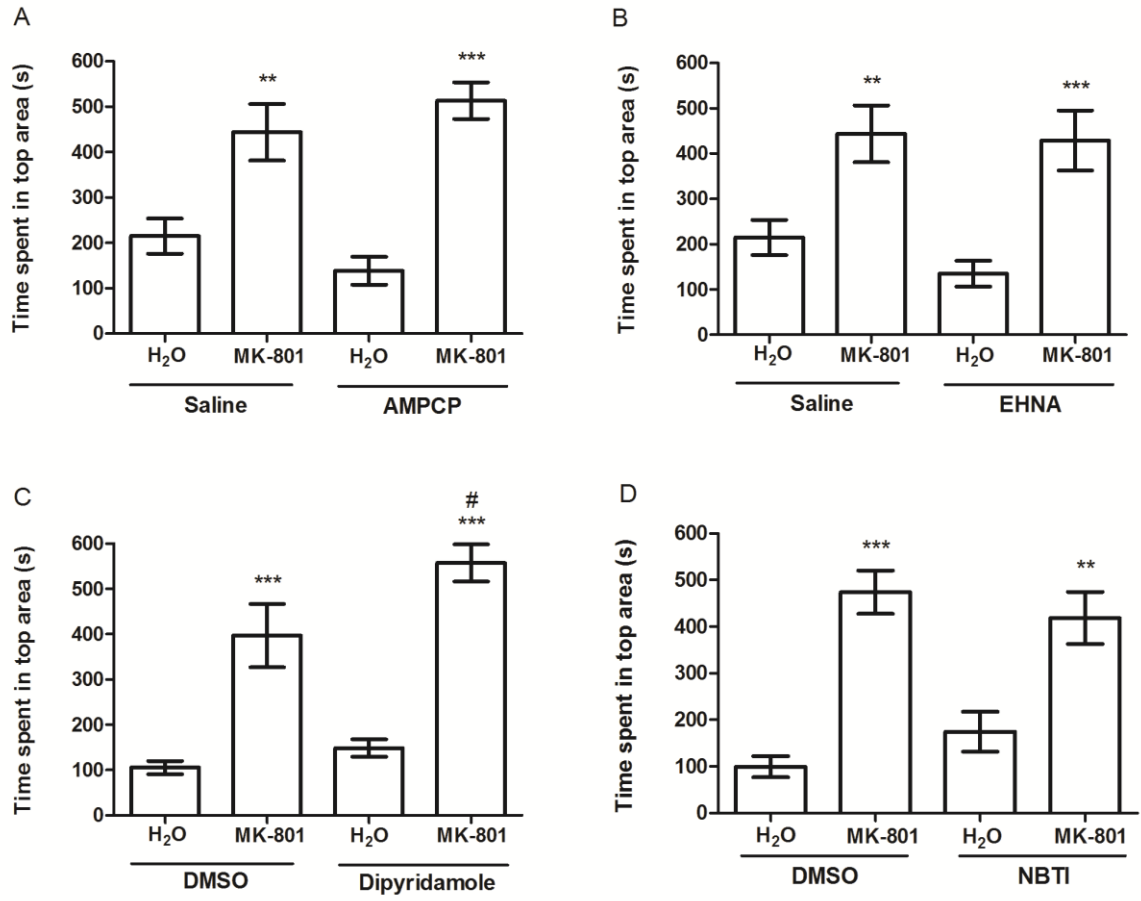


Figure 6

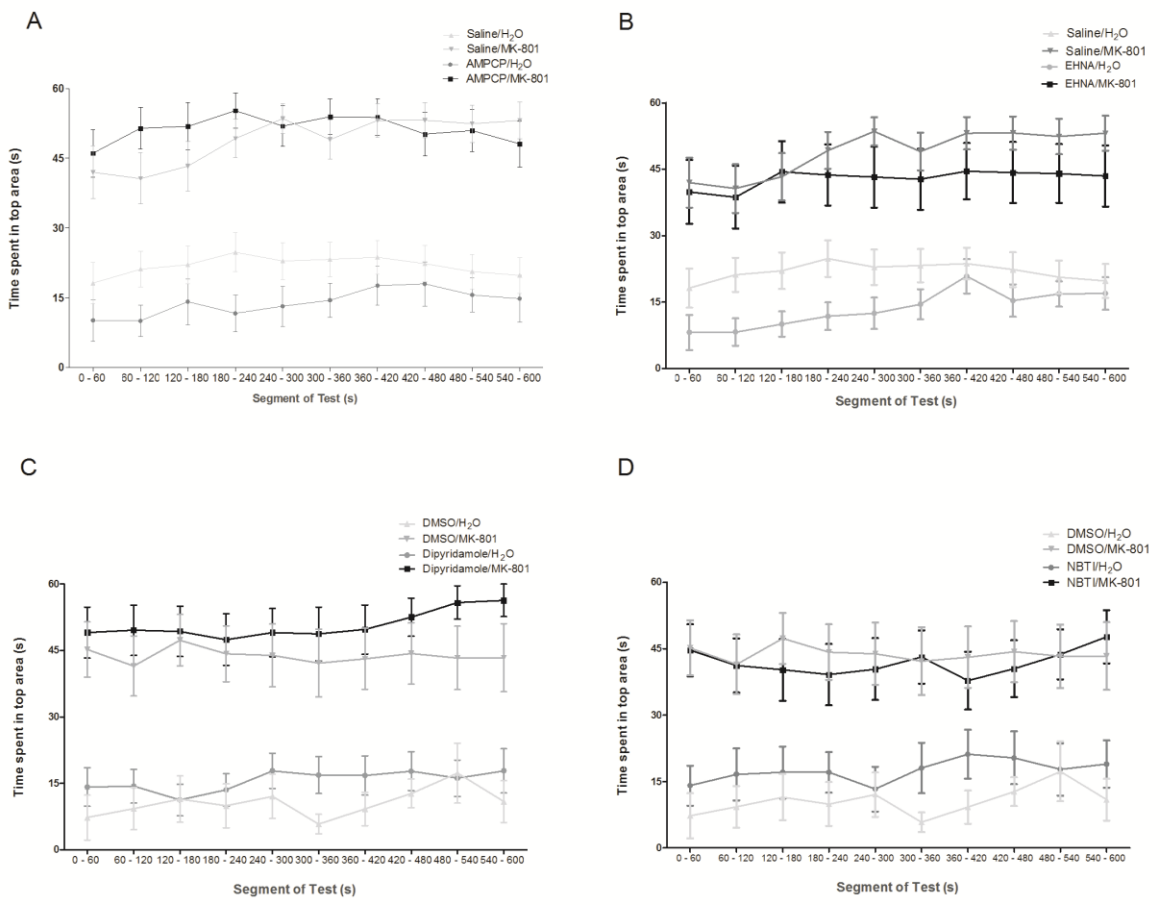
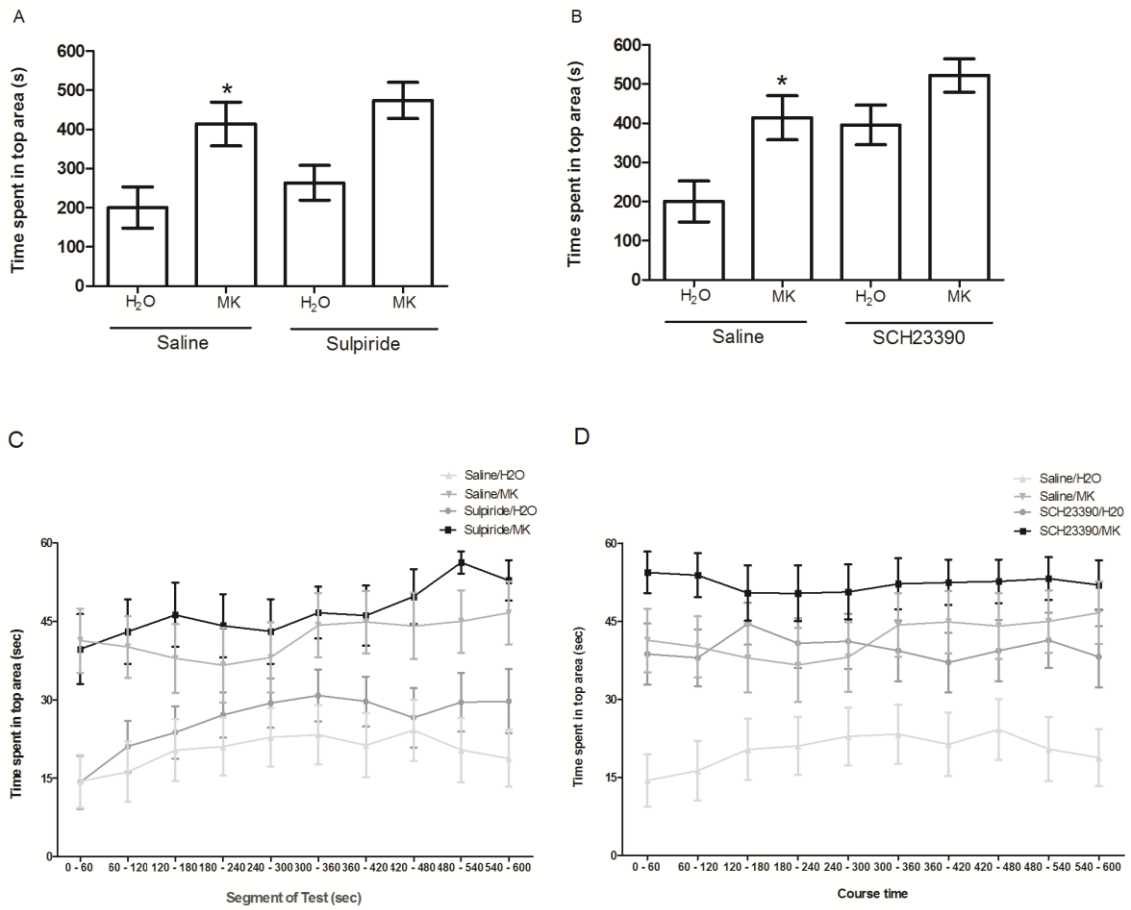


Figure 7



CAPÍTULO 3: CONSIDERAÇÕES FINAIS

A depressão é uma doença multifatorial grave e pacientes deprimidos apresentam risco aumentado de eventos cardiovasculares e suicídio. Este transtorno psiquiátrico afeta milhões de pessoas no mundo e estima-se que será a segunda maior causa de morte no ano 2020 (Fabbri et al, 2012;. Zarate et al, 2013). Os fármacos atualmente disponíveis não são absolutamente eficazes, tendo em vista o fato de que os pacientes apresentam recidivas e sintomas persistentes (Ates-Alagoz & Adejare, 2013). Os fármacos antidepressivos ISRS atuam na inibição da recaptção de serotonina através de proteínas transportadoras. Desta forma, a serotonina permanece ligada aos receptores agindo por mais tempo na fenda sináptica. Além disso, a ligação dos fármacos aos receptores ocorre com duração e potência diferentes, conferindo resultados clínicos distintos para cada paciente (Sghendo et al., 2011). Devido ao grande número de pacientes com depressão, comorbidades e o impacto econômico da doença, surge a necessidade de novos alvos terapêuticos mais eficazes e de início de ação rápido.

O mecanismo neurobiológico da depressão está relacionado com o sistema serotoninérgico, porém estudos mostram que outros sistemas de neurotransmissão, como os sistemas purinérgico (Sperlagh et al., 2012) e dopaminérgico (Willner et al., 2005; Papakostas et al., 2006) também estão envolvidos.

O envolvimento do sistema purinérgico na fisiopatologia dos transtornos de humor, como a depressão, deve-se ao fato da adenosina regular o humor, sono, atividade, apetite, cognição, memória, limiar convulsivo, interação social e a impulsividade. Estudos genéticos mais recentes sugerem que o sistema purinérgico, especialmente a modulação dos subtipos de receptores P1 e P2, desempenha um papel importante em transtornos de humor (Backlund et al., 2012; Ortiz et al., 2014).

Willner (2005) e Papakostas (2006) mostraram em seus estudos que a desregulação do sistema dopaminérgico está implicada na patogênese da depressão. A disfunção da neurotransmissão dopaminérgica no sistema mesolímbico pode contribuir para anedonia, perda de motivação e retardo psicomotor nos transtornos depressivos graves. Além disso, a dopamina ao ligar-se no receptor D3 regula a motivação e o comportamento relacionado com a recompensa. Desta forma, sugere-se que a modulação do sistema dopaminérgico pode representar um complemento promissor para antidepressivos tradicionais, especialmente no tratamento da anedonia e apatia (Leggio et al., 2013; Bonci e Hopf, 2005).

Diferentes estudos demonstram que doenças como Alzheimer, epilepsia, dor crônica, esquizofrenia, doença de Parkinson, ansiedade e transtorno depressivo maior são desenvolvidos a partir de distúrbios na sinalização NMDA (Kaster et al., 2012; Ates-Alagoz e Adejare, 2013). O uso de antagonistas dos receptores NMDA em diferentes modelos animais para depressão induziu efeitos do tipo antidepressivo (Ates-Alagoz e Adejare, 2013). O MK-801 é um antagonista do receptor NMDA não competitivo e suas propriedades antidepressivas foram avaliadas através de diferentes estudos comportamentais (Ates-Alagoz e Adejare, 2013). Evidências mostram que o MK-801 provoca efeitos ansiolíticos, aumento na mobilidade e diminuição da aprendizagem e memória (Zarrindast et al., 2012). Por conseguinte, considera-se que os antagonistas dos receptores NMDA podem ser úteis para o desenvolvimento de uma nova geração de melhores tratamentos para a depressão. Estudos anteriores demonstram que a exposição aguda de MK-801 induz um comportamento ansiolítico, aumento do movimento e de preferência pela área superior do aquário (Seibt et al., 2010; Zarrindast et al., 2012). Seibt et al., (2010) mostraram que a exposição à 20 μ M MK-801 apresentaram alterações comportamentais como prejuízo na memória e déficit de interação social.

Duman (2014) relata que os antagonistas NMDA, como a cetamina, promovem a desinibição da transmissão de glutamato, gerando uma resposta rápida e transitória. Outros estudos indicam que os agentes capazes de aumentar a liberação de glutamato ou que atuam diretamente sobre os receptores de AMPA pós-sinápticos também podem apresentar rápidos efeitos antidepressivos (Maeng et al., 2008). Estudos mostram que os receptores de adenosina A₁ diminuem a liberação de glutamato, atenuando a impulsividade motora (Marek, 2012). A modulação dos níveis de adenosina extracelular é promovida pela ação de ecto-5'-nucleotidase e adenosina deaminase, enzimas responsáveis pela produção e degradação de adenosina, respectivamente. Outro importante mecanismo para controlar os níveis de adenosina extracelular envolve a ação de NTs. Dipiridamol diminui a recaptção da adenosina, aumentando a biodisponibilidade deste nucleosídeo na fenda sináptica, o que potencializa o seu efeito (Kulkarni e Mehta, 1985). Kalueff et al., (2009) demonstraram que a administração crônica de fluoxetina produziu efeitos fortes sobre o comportamento do peixe-zebra, incluindo significativamente menor latência para entrar na parte superior do tanque, mais tempo gasto no topo, e mais transições para o topo. O número de movimentos

erráticos também foi reduzido drasticamente em peixes tratados com ISRS. Estes estudos foram utilizados como base para não utilização de controle positivo no experimento.

Em nosso estudo, analisamos o papel do sistema purinérgico e dopaminérgico no efeito tipo-antidepressivo induzido por MK-801 em peixe-zebra. Inicialmente, foi realizada uma curva de dose x tempo para determinar a concentração de MK-801 e o tempo de tratamento capaz de promover o efeito tipo-antidepressivo esperado. Observou-se que os animais expostos a 5 μ M MK-801 durante 30 minutos permaneceram na parte superior do aquário por até 2 horas após a exposição. No entanto, os animais expostos a 20 μ M MK-801 apresentaram preferência pela parte superior do aquário após 4 horas de exposição. Passadas 24h da exposição, os animais apresentaram preferência pelo fundo do tanque, como observado no grupo controle. A exposição repetida ao MK-801 também foi avaliada. Os animais foram expostos a 20 μ M MK-801 por 30 minutos, uma vez ao dia durante 7 dias consecutivos. Os resultados mostraram um padrão de resposta comportamental que foi semelhante a partir do primeiro até o 7^o dia. Os grupos tratados e controle foram analisados antes de cada exposição diária, a fim de excluir possíveis alterações comportamentais induzidas por um comportamento adaptável ao ambiente. Entretanto, os resultados mostraram que os animais permaneceram no topo do aquário somente por 4 horas após a exposição. Portanto, estes resultados sugerem que o MK-801 apresenta efeito tipo-antidepressivo rápido, não cumulativo e que não é alterado pela exposição repetida. O efeito agudo observado está de acordo com estudos anteriores, como a cetamina, que investigaram outros antagonistas dos receptores NMDA não competitivos (Naughton et al., 2014).

Considerando-se que a sinalização de adenosina modula comportamentos normais e patológicos e está envolvida no humor e motivação, foi investigada a influência de receptores de adenosina e a modulação dos níveis de adenosina sobre os efeitos tipo-antidepressivos induzidos por MK-801. Analisou-se a influência de antagonistas e agonistas dos receptores de adenosina. Foram utilizados: cafeína, antagonista não seletivo dos receptores de adenosina; DPCPX, antagonista do receptor de adenosina A_1 ; ZM 241385, antagonista do receptor de adenosina A_{2A} ; CPA, agonista do receptor de adenosina A_1 ; e CGS 21680, agonista do receptor de adenosina A_{2A} . Observamos que o pré-tratamento com cafeína, antagonista não seletivo da adenosina, inibiu o efeito tipo-antidepressivo induzido por MK-801. A

cafeína estimula a atividade locomotora, modula o início e a qualidade do sono e melhora a atenção e memória (Cunha e Agostinho, 2010; Rivera-Oliver e Díaz-Ríos, 2014). A ação farmacológica da cafeína se dá através do antagonismo não seletivo dos receptores de adenosina, A_1 e A_{2A} , como alvos preferenciais. Em função de tais ações, as evidências indicam que a cafeína aumenta a liberação de GABA por bloqueio do receptor A_1 (Ferreira et al., 2014). Da Silva et al. (2005) demonstraram que o bloqueio do receptor A_1 pela cafeína reduz o efeito locomotor induzido por MK-801, diminuindo a liberação de GABA. Os nossos resultados mostraram que DPCPX, um antagonista seletivo do receptor A_1 , promoveu um efeito semelhante ao observado para a cafeína, impedindo os efeitos tipo-antidepressivos do MK-801. Além disso, os nossos dados demonstram que não há envolvimento dos receptores A_{2A} no efeito tipo-antidepressivo de MK-801. Portanto, os nossos resultados indicam que o efeito tipo-antidepressivo induzido por MK-801 depende da ativação de receptores A_1 , o que poderia influenciar a neurotransmissão GABAérgica (Da Silva et al., 2005). Além disso, a modulação dos níveis de adenosina foi investigada através de pré-tratamento com AMPCP, um inibidor da ecto-5'-nucleotidase, e EHNA, inibidor da ADA, Dipiridamol, inibidor da captação de adenosina e NBTI, inibidor dos transportadores equilibrativos de adenosina. Os dados mostraram que o dipiridamol exacerba os efeitos tipo-antidepressivos induzidos por MK-801, possivelmente devido a um aumento nos níveis de adenosina extracelular promovidos pela inibição dos transportadores de nucleosídeos.

A interação das vias glutamatérgicas e dopaminérgicas está envolvida na modulação de comportamentos relacionados à ansiedade. Zarrindast et al. (2012) mostraram que a administração de MK-801 induziu comportamentos ansiolíticos, os quais foram potencializados pelo antagonista do receptor de dopamina D1 (SCH23390) e bloqueados pelo antagonista do receptor de dopamina D2 (sulpirida). Estes autores não observaram mudanças na atividade locomotora, indicando que as doses aplicadas não parecem afetar os comportamentos relacionados à ansiedade. Alguns estudos têm mostrado que o aumento na atividade locomotora induzida por antagonistas do receptor de NMDA pode ser associado ao aumento da síntese, liberação, e o metabolismo de dopamina em várias regiões do cérebro. Os nossos resultados mostraram que o pré-tratamento com antagonistas dos receptores D1/D2/D3 não alterou as respostas comportamentais induzidas pelo MK-801. Estes

achados demonstram que o efeito tipo-antidepressivo induzido por MK-801 no peixe-zebra parece não estar diretamente relacionado ao sistema dopaminérgico.

Em resumo, nossos resultados sugerem que o efeito tipo-antidepressivo induzido por MK-801 em peixe-zebra é envolve a ativação do receptor de adenosina A_1 . Além disso, as nossas constatações indicam que os receptores A_{2A} , enzimas metabolizadoras de nucleosídeos e a sinalização dopaminérgica não estão diretamente envolvidos no efeito tipo-antidepressivo induzido por MK-801 em peixe-zebra.

REFERÊNCIAS

Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H. Purinergic signaling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* 2009; 32(1):19-29.

Amitai N, Semenova S, Markou A. Cognitive-disruptive effects of the psychotomimetic phencyclidine and attenuation by atypical antipsychotic medications in rats. *Psychopharmacology* 2007; 193: 521-37.

Ates-Alagoz Z, Adejare, A. NMDA Receptor Antagonists for Treatment of Depression. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 2013; 6(4), 480–99. doi:10.3390/ph6040480.

Backlund L, Lavebratt C, Frise´n L, Nikamo P, Sudic DH, Träskman-Bendz L, Lande´n M, Edman G, Vawter MP, Ösby U, Schalling M. P2RX7: Expression Responds to Sleep Deprivation and Associates with Rapid Cycling in Bipolar Disorder Type 1. *PLoS One.* 2012; 7(8): e43057.

Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, Bedell JA, McPherson JD, Johnson SL. The syntenic relationship of the *zebrafish* and human genomes. *Genome Res.* 2000; 10(9): 1351-8.

Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev.* 2011; 63: 182-217.

Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry.* 2000;47(4):351-4

Bigonnesse F, Lévesque SA, Kukulski F, Lecka J, Robson SC, Fernandes MJG, et al. Cloning and characterization of mouse nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-8. *Biochemistry.* 2004; 43: 5511-5519.

Bjorklund A, Dunnett SB. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* 2007; 30: 194-202.

Blank M, Guerim LD, Cordeiro RF, Vianna MR. A one-trial inhibitory avoidance task to *zebrafish*: Rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2009; 92: 529-534.

Bonci A and Hopf FW. The Dopamine D2 Receptor: New Surprises from an Old Friend. *Neuron*, 2005. Vol. 47, 335–338. doi 10.1016/j.neuron.2005.07.015.

Boehmler W, Obrecht-Pflumio S, Canfield V, Thisse C, Thisse B, Levenson R. Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in *zebrafish*. *Dev Dyn.* 230: 481-493, 2004.

Boehmler W, Carr T, Thisse C, Thisse B, Canfield VA, Levenson R. D4 dopamine receptor genes of *zebrafish* and effects of the antipsychotic clozapine on larval swimming behavior. *Genes Brain Behav.* 6: 155-166, 2007.

Boehmler W, Petko J, Woll M, Frey C, Thisse B, Thisse C, Canfield VA, Levenson R. Identification of *zebrafish* A2 adenosine receptors and expression in developing embryos. *Gene Expr Patterns.* 9(3):144-51, 2009.

Bonan CD, Amaral OB, Rockenbach IC, Walz R, Battastini AM, Izquierdo I, Sarkis JJ. Altered ATP hydrolysis induced by pentylentetrazol kindling in rat brain synaptosomes. *Neurochem Res.* 2000; 25: 775-779.

Bonan CD. Ectonucleotidases and nucleotide/nucleoside transporters as pharmacological targets for neurological disorders. *CNS NeurolDisord Drug Targets* 2012; 11: 739-750.

Bowton E, Saunders C, Erreger K, Sakrikar D, Matthies HJ, Sen N, Jessen T, Colbran RJ, Caron MG, Javitch JA, Blakely RD, Galli A. Dysregulation of dopamine transporters via dopamine D2 autoreceptors triggers anomalous dopamine efflux associated with attention-deficit hyperactivity disorder. *J Neurosci.* 2010; 30: 6048-6057.

Burnstock, G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev.* 1972; 24: 509-581.

Burnstock, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor, in *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*, 1978, eds Straub, R. W., Bolis, L. (New York, NY: Raven Press), 107–118.

Burnstock G. Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 47 -52.

Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64, 1471 – 1483.

Burnstock G. Purinergic signaling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7 (7): 575 – 590.

Burnstock G, Krügel U, Abbracchio MP, Illes P. Purinergic signaling: from normal behavior to pathological brain function. *Prog Neurobiol* 2011; 95 (2): 229 - 74.

Burnstock, G, Verkhratsky A. Evolutionary origins of the purinergic signaling system. *Acta Physiol (Oxf).* 2009; 195: 415-447.

Capiotti KM, Menezes FP, Nazario LR, Pohlmann JB, de Oliveira GM, Fazenda L, Bogo MR, Bonan CD, Da Silva RS. Early exposure to caffeine affects gene expression of adenosine receptors, DARPP-32 and BDNF without affecting sensibility and morphology of developing *zebrafish* (*Danio rerio*). *Neurotoxicol Teratol.* 2011; 33: 680-685.

Carús-Cadavieco M, de Andrés I. Adenosina y control homeostático del sueño. Acciones en estructuras diana de los circuitos de vigilia y sueño. *Rev Neurol*. 2012; 55: 413-420.

Chaturvedi HK, Bapna JS, Chandra D. Effect of fluvoxamine and N-methyl-D-aspartate receptor antagonists on shock-induced depression in mice. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2001; 45(2):199-207.

Cheng, Kenneth T. [¹¹C]Norepinephrine. Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD). National Center for Biotechnology Information, NLM, NIH, Bethesda, MD. Created: February 14, 2006; Last Update: May 12, 2008.

Coelho JE, Alves P, Canas PM, Valadas JS, Shmidt T, Batalha VL, Ferreira DG, Ribeiro JA, Bader M, Cunha RA, do Couto FS, Lopes LV. Overexpression of Adenosine A2A Receptors in Rats: Effects on Depression, Locomotion, and Anxiety. *Front Psychiatry*. 2014;5:67. doi: 10.3389/fpsy.2014.00067.

Cognato GP, Bortolotto JW, Blazina AR, Christoff RR, Lara DR, Vianna MR, Bonan CD. Y-Maze memory task in *zebrafish* (*Danio rerio*): The role of glutamatergic and cholinergic systems on the acquisition and consolidation periods. *Neurobiol Learn Mem*. 2012; 98: 321-328.

Coyle JT, Tsai G, Goff D. Coverging evidence of NMDA receptor hypofuncion in the pathophysiology of schizophrenia. *Ann NY Aad Sci* 2003; 1003: 318-327.

Crema LM, Pettenuzzo LF, Schlabitz M, Diehl L, Hoppe J, Mestriner R, Laureano D, Salbego C, Dalmaz C, Vendite D. The effect of unpredictable chronic mild stress on depressive-like behavior and on hippocampal A1 and striatal A2A adenosine receptors. *Physiol Behav* 2013;109:1-7. doi: 10.1016/j.physbeh.2012.11.001.

Cunha RA, Agostinho PM. Chronic caffeine consumption prevents memory disturbance in different animal models of memory decline. *J Alzheimers Dis* 2010;20 Suppl 1:S95-116. doi: 10.3233/JAD-2010-1408.

Da Silva RS, Hoffman A, de Souza DO, Lara DR, BonanCD. Maternal caffeine intake impairs MK-801-induced hyperlocomotion in young rats. *Eur J Pharmacol* 2005, 509(2-3): 155–9. doi:10.1016/j.ejphar.2005.01.001

Dias-Hernandez M, Cox JA, Migita K, Haines W, Egan TM, Voigt MM. Cloning and characterization of two novel *zebrafish* P2X receptor subunits. *Biochem Biophys Res Com*. 295: 849-853, 2002.

Dutta A, McKie S, Deakin JF. Ketamine and other potential glutamate antidepressants. *Psychiatry Res*. 2015;225(1-2):1-13.

Egana RJ, Bergnera CL, Harta PC, Cachatb JM, Canavellob PR, Eleganteb MF, Eikhayatb SI, Bartelsb BK, Tiend AK, Tiend DH, Mohnotb S, Beesonb S, Glasgowa E, Amria H, Zukowskaa Z, Kalueff AV. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in *zebrafish*. *Behav Brain Res*. 2009 December 14; 205(1): 38–44. doi:10.1016/j.bbr.2009.06.022.

El Yacoubi M, Ledent C, Menard JF, Parmentier M, Costentin J, Vaugeois JM. The stimulant effects of caffeine on locomotor behaviour in mice are mediated through its blockade of adenosine A(2A) receptors. *Br J Pharmacol.* 2000; 129: 1465-1473.

Fabbri C, Girolamo G, Serretti A. Pharmacogenetics of Antidepressant Drugs: An Update After Almost 20 Years of Research. *Am J Med Genet Part B* 2012; 9999:1–34.

Ferreira DP, Stutz B, de Mello FG, Reis R a M, Kubrusly RCC. Caffeine potentiates the release of GABA mediated by NMDA receptor activation: Involvement of A1 adenosine receptors. *Neuroscience* 2014, 281C: 208–215. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.09.060

Fields RD and Burnstock G. Purinergic signalling in neuro-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7, 423 – 436.

Filby AL, Paull GC, Hickmore TFA, Tyler CR. Unravelling the neurophysiological basis of aggression in a fish model. *BMC Genomics* 2010, 11:498.

Franco R, Casado V, Ciruela F, Saura C, Mallol J, Canela EI, Luis C. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog Neurobiol* 1997; 52 (4): 283-94.

Fredholm BB, Dunwiddie TV. How does adenosine inhibit transmitter release? *Trends Pharmacol Sci.* 1988; 9: 130-134.

Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacol Rev* 53:527–552, 200.

Gashemi M, Raza M, Dehpour AR. NMDA receptor antagonists augment antidepressant-like effects of lithium in the mouse forced swimming test. *Journal of Psychopharmacology.* 2010; 24(4) 585–594.

Gerlai R, Fernandes Y, Pereira T. Zebrafish (*Danio rerio*) responds to the animated image of a predator: towards the development of an automated aversive task. *Behav Brain Res.* 2009; 201: 318-324.

Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav* 2000; 67(4): 773 – 782.

Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl)* 2001, 156: 117 – 54.

Goldsmith P. *Zebrafish* as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol.* 2004; 4(5):504-12.

Gregory M, Jagadeeswaran P. Selective labeling of *zebrafish* thrombocytes: quantitation of thrombocytes function and deletion during development. *Blood Cells Mol Dis.* 29: 286-295, 2002.

Griffiths BB, Schoonheim PJ, Ziv L, Voelker L, Baiern H, Gahtan E. A zebrafish model of glucocorticoid resistance shows serotonergic modulation of the stress response. *Frontiers in Behavioral Neuroscience.* October 2012; doi: 10.3389/fnbeh.2012.00068.

Guo, S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from *zebrafish*? *Genes Brain Behav.* 2004; 3(2): 63-74.

Haenisch B, Bonisch. Depression and antidepressants: Insights from knockout of dopamine, serotonin or noradrenaline re-uptake transporters. *Pharmacology & Therapeutics* 2011; 1290: 352–368.

Heal DJ, Cheetham SC & Smith SL. The neuropharmacology of ADHD drugs in vivo: insights on efficacy and safety. *Neuropharmacology* 2009; 57, 608-618.

Hirschfeld RM. Differential diagnosis of bipolar disorder and major depressive disorder. *J Affect Disord.* 2014 Dec;169S1:S12-S16.

Hirschhorn R, Ratch H. Isozymes of adenosine deaminase. *Isozymes Curr Top Biol Med Res.* 4: 131-157, 1980.

Hodgson RA, Bertorelli R, Varty GB, Lachowicz JE, Forlani A, Fredduzzi S, Cohen-Williams ME, Higgins GA, Impagnatiello F, Nicolussi E, Parra LE, Foster C, Zhai Y, Neustadt BR, Stamford AW, Parker EM, Reggiani A, Hunter JC. Characterization of the potent and highly selective A2A receptor antagonists preladenant and SCH 412348 [7-[2-[4-(2,4-difluorophenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-2-(2-furanyl)-7H-pyrazolo[4,3-e][1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidin-5-amine] in rodent models of movement disorders and depression. *J PharmacolExpTher.* 2009; 330(1):294-303.

Holzschuh J, Ryu S, Aberger F, Driever W Dopamine transporter expression distinguishes dopaminergic neurons from other catecholaminergic neurons in the developing *zebrafish* embryo. *Mech Dev.* 101: 237–43, 2001.

Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature.* 2013; 496(7446):498-503.

Hori H, Kunugi H. The Efficacy of Pramipexole, a Dopamine Receptor Agonist, as an Adjunctive Treatment in Treatment-Resistant Depression: An Open-Label Trial. *ScientificWorldJournal.* 2012; 2012:372474. doi: 10.1100/2012/372474.

Ipata PL, Camici M, Micheli V, Tozz MG. Metabolic network of nucleosides in the brain. *Curr Top Med Chem* 2011; 11: 909-922.

IsHak WW, Mirocha J, Cristensen S, et al. Patient-reported outcomes of quality of life, functioning, and depressive symptom severity in major depressive disorder

comorbid with panic disorder before and after ssri treatment in the star*d trial. *Depression and anxiety* 2013; 00:1–10.

Iversen SD, Iversen LL. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci.* 2007; 30: 188-193.

Jenner P. An overview of adenosine A2A receptor antagonists in Parkinson's disease. *IntRevNeurobiol.* 2014;119:71-86. doi:10.1016/B978-0-12-801022-8.00003-9.

Kaster MP, Budni J, Gazal M, Cunha MP, Santos AR, Rodrigues AL. The antidepressant-like effect of inosine in the FST is associated with both adenosine A1 and A2A receptors. *Purinergic Signal.* 2013; 9(3):481-6. doi:10.1007/s11302-013-9361-8.

Kaster MP, Machado DG, Santos ARS, Rodrigues AL. Involvement of NMDA receptors in the antidepressant-like action of adenosine. *Pharmacological Reports* 2012; 64, 706-713

Kaster MP, Rosa AO, Rosso MM, Goulart EC, Santos AR, Rodrigues AL. Adenosine administration produces an antidepressant-like effect in mice: evidence for the involvement of A1 and A2A receptors. *NeurosciLett.* 2004;355(1-2):21-4.

Kulkarni SK, Mehta AK. Purine nucleoside--mediated immobility in mice: reversal by antidepressants. *Psychopharmacology (Berl).* 1985;85(4):460-3.

Lange M, Norton W, Coolen M, Chaminade M, Merker S, Proft F, Schmitt A, Vernier P, Lesch K-P, Bally-Cuif L. The ADHD-susceptibility gene *lphn3.1* modulates dopaminergic neuron formation and locomotor activity during zebrafish development. *Molecular Psychiatry* 17, 946-954 (September 2012) | doi:10.1038/mp.2012.29

La Sala A, Ferrari D, Di Virgilio F, Idzko M, Norgauer J, Girolomoni G. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. *J Leukoc Biol*, 2003; 73: 339-343.

Leggio GM, Salomone S, Bucolo C, Platania C, Micale V, Caraci F, Drago F. Dopamine D₃ receptor as a new pharmacological target for the treatment of depression. *Eur J Pharmacol.* 2013 Nov 5;719(1-3):25-33. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.07.022.

Maeng S, Zarate CA Jr, Du J, Schloesser RJ, McCammon J, Chen G, Manji HK. Cellular mechanisms underlying the antidepressant effects of ketamine: role of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors. *Biol Psychiatry.* 2008; 63(4):349-52.

Maier SA, Galellis JR, McDermid HE. Phylogenetic analysis reveals a novel protein family closely related to adenosine deaminase. *J Mol Evol.* 2005; 61: 776-794.

Marek GJ. Activation of adenosine₁ receptors induces antidepressant-like, anti-impulsive effects on differential reinforcement of low-rate 72-s behavior in rats. *J PharmacolExpTher*. 2012;341(2):564-70. doi: 10.1124/jpet.112.191718.

Maximino C, Lima MG, Olivera KR, Picanço-Diniz DL, Herculano AM. Adenosine A₁, but not A₂, receptor blockade increases anxiety and arousal in *Zebrafish*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011; 109: 203-207.

Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*. 1998; 78: 189-225.

Naughton M, Clarke G, O'Leary OF, Cryan JF, Dinan TG. A review of ketamine in affective disorders: Current evidence of clinical efficacy, limitations of use and pre-clinical evidence on proposed mechanisms of action. *Journal of Affective Disorders* 156(2014)24–35

Ninan I, Kulkarni SK. Preferential inhibition of dizocilpine-induced hyperlocomotion by olanzapine. *Eur J Pharmacol* 1999; 368:1-7.

Norton WH, Rohr KB, Burnstock G. Embryonic expression of P2X(3) receptor encoding gene in *zebrafish*. *Mech Dev*. 2000; 9: 149-152.

O'Neill MF, Shaw G. Comparison of dopamine receptor antagonists on hyperlocomotion induced by cocaine, amphetamine, MK-801 and the dopamine D₁ agonist C-APB in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 1999; 145: 237-50.

Ortiz R, Ulrich H, Zarate CA Jr, Machado-Vieira R. Purinergic system dysfunction in mood disorders: a key target for developing improved therapeutics. *Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2015; Mar 3; 57C: 117-131

Palucha A, Pilc A. The Involvement of Glutamate in the Pathophysiology of Depression. *Drugs News Perspect* 205; 18(4):262.

Papakostas GI. Dopaminergic-based pharmacotherapies for depression. *Neuropsychopharmacol*. 2006;16(6):391-402

Paksereshet S, Boustani H, Azemi ME, Nilsaz J, Babapour R, Hagh dust MR. Evaluation of Pharmaceutical Products of St. John's Wort Efficacy Added on Tricyclic Antidepressants in treating Major Depressive Disorder: A Double Blind Randomized Control Trial. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*. 2012; 7(3):106-110

Poleszak E, Socata K, Szopa A, Wrobel A, Szewczyk B, Kasperek R, Blicharska E, Nowak G, Wlaz P. Involvement of NMDA receptor complex in the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide in mice. *J Neural Transm* (2011) 118:857–864 DOI 10.1007/s00702-011-0585-x.

Powell CM, Miyakawa T. Schizophrenia-relevant behavioral testing in rodent models: a uniquely human disorder? *Biol Psychiatry* 2006; 59 (12): 198-207.

Porkka-Heiskanen T. Adenosine in sleep and wakefulness. *Ann Med.* 1999; 31: 125-129.

Pruus K, Rudissaar R, Allikmets L, Harro J. The effect of the NMDA receptor antagonist dizocilpine on behavioral manifestations of serotonin and adrenergic antidepressants in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2010 Mar;32(2):123-8.

Ribeiro JA, Sebastiao AM, Mendonca A. Participation of adenosine receptors in neuroprotection. *Drug News Perspect.* 2003; 16: 80-86.

Rico EP, Rosemberg DB, Seibt KJ, Capiotti KM, Da Silva RS, Bonan CD. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *NeurotoxicolTeratol.* 2011; 33: 608-617.

Rico EP, Senger MR, Fauth MG, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of *zebrafish* (*Danio rerio*). *Life Sci.* 73:2071–2082, 2003.

Rink E, Wullimann MF. The teleostean (*zebrafish*) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum). *Brain Research.* 889: 316–330, 2001.

Rink E, Wullimann MF. Connections of the ventral telencephalon and tyrosine hydroxylase distribution in the zebra brain (*Danio rerio*) lead to identification of an ascending dopaminergic system in a teleost. *Brain Res Bull.* 2002; 57:385-397.

Rice ME, Patel JC, Cragg SJ. Dopamine Release in the basal ganglia. *Neuroscience* 2011; 198, 112–137.

Rivera-Oliver M, Díaz-Ríos M. Using caffeine and other adenosine receptor antagonists and agonists as therapeutic tools against neurodegenerative diseases: a review. *Life Sci.* 2014;101(1-2):1-9. doi: 10.1016/j.lfs.2014.01.083.

Robson SC, Sevigny J and Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure, function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2006; 2, 409 – 430.

Rosemberg DB, Rico EP, Guidoti MR, Dias RD, Souza DO, Bonan CD, Bogo MR. Adenosine deaminase-related genes: molecular identification, tissue expression pattern and truncated alternative splice isoform in adult *zebrafish* (*Danio rerio*). *Life Sci.* 81: 1526-34, 2007.

Rosemberg DB, Rico EP, Senger MR, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD, Souza DO. Kinetic characterization of adenosine deaminase activity in *zebrafish* (*Danio rerio*) brain. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 151: 96-101, 2008.

Rosemberg DB, Rico EP, Langoni AS, Spinelli JT, Pereira TC, Dias RD, et al. NTPDase family in *zebrafish*: nucleotide hydrolysis, molecular identification and gene expression profiles in brain, liver and heart. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2010b; 155: 230-240.

Saji H, Iida Y, Kawashima H, Ogawa M, Kitamura Y, Mukai T, Shimazu S, Yoneda F. *In vivo* imaging of brain dopaminergic neurotransmission system in small animals with high-resolution single photon emission computed tomography. *Anal Sci.* 2003; 19: 67-71.

Schneider AC, Santos JL, Porawski M, Schaefer G, et al. Implementation of a new experimental animal model – *Zebrafish*. *Rev HCPA* 2009; 29(2):100-103.

Seibt KJ, Oliveira RL, Rico EP, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Antipsychotic drugs inhibit nucleotide hydrolysis in *zebrafish* (*Danio rerio*) brain membranes. *Toxicol In Vitro.* 2009; 23:78-82.

Seibt KJ, Oliveira RL, Rico EP, Bonan CD et. al. Antipsychotic drugs prevent the motor hyperactivity induced by psychotomimetic MK-801 in *zebrafish* (*Danio rerio*). *Behav Brain Res.* 2010; 214: 417 – 422.

Seibt KJ, Piato AL, da Luz Oliveira R, Capiotti KM, Vianna MR, Bonan CD. Antipsychotic drugs reverse MK-801-induced cognitive and social interaction deficits in *zebrafish* (*Danio rerio*). *Behav Brain Res.* 2011; 224(1):135-9.

Senger MR, Rico EP, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Ecto-5'-nucleotidase activity in brain membranes of *zebrafish* (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 139(2): 203–207, 2004.

Sghendo L, Mifsud J. Understanding the molecular pharmacology of the serotonergic system: using fluoxetine as a model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2011; 64, 317–325.

Shen HY, Chen JF. Adenosine A_{2A} receptors in psychopharmacology: modulators of behavior, mood and cognition. *Curr Neuropharmacol.* 2009; 7: 195-206.

Shen HY, Singer P, Lytle N, Wei CJ, Lan JQ, Williams-Karnesky RL, Chen JF, Yee BK, Boison D. Adenosine augmentation ameliorates psychotic and cognitive endophenotypes of schizophrenia. *J Clin Invest.* 2012; 122: 2567-2577.

Sison M, Gerlai R. Associative learning performance is impaired in *zebrafish* (*Danio rerio*) by the NMDA-R antagonist MK-801. *Neurobiol Learn Mem.* 2011;96(2):230-7.

Sloman KA, Scott GR, Diao Z, Rouleau C, Wood CM, McDonald DG. Cadmium affects the social behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat Toxicol.* 2003; 65: 171-185.

Sperlagh B, Csölle C, et al. The role of purinergic signaling in depressive disorders. *Neuropsychopharmacologia Hungarica XIV. évf. 4. szám* 231, 2012.

Stewart A M, Ullmann J F P, Norton W H J, Parker M O, Brennan C H, Gerlai R, Kalueff A V. Molecular psychiatry of zebrafish. *Molecular Psychiatry*, (28 October 2014) | doi:10.1038/mp.2014.128

Swain HA, Sigstad C, Scalzo FM. Effects of dizocilpine (MK-801) on circling behavior, swimming activity, and place preference in *zebrafish* (*Danio rerio*). *Neurotoxicol Teratol*. 2004 Nov-Dec;26(6):725-9.

Von Lubitz DK. Adenosine and cerebral ischemia: therapeutic future or death of a brave concept? *Eur. J. Pharmacol*. 1999; 371: 85-102.

Wei CJ, Singer P, Coelho J, Boison D, Feldon J, Yee BK, Chen JF. Selective inactivation of adenosine A(2A) receptors in striatal neurons enhances working memory and reversal learning. *Learn Mem*. 2011; 18: 459-474.

Westerfield M. The *zebrafish* book. A guide for the laboratory use of *zebrafish* (*Danio rerio*). Eugene: university of Oregon Press, 2000. Disponível em: <http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html> Acesso em: 10 de setembro de 2013.

Willner P, Hale AS, Argyropoulos S. Dopaminergic mechanism of antidepressant action in depressed patients. *J Affect Disord*. 2005;86(1):37-45.

Wong K, Elegante M, Bartels B, Elkhayat S, Tien D, Roy S, et al. Analyzing habituation responses to novelty in *zebrafish* (*Danio rerio*). *Behav Brain Res*. 2010; 208: 450–457.

Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signaling cascade. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783(5): 673-94.

Zarate C, Duman RS, Liu G, Sartori S, Quiroz J, Murck H. New paradigms for treatment-resistant depression. *Ann N Y Acad Sci*. 2013; 1292(1):21-3.

Zarrindast MR, Nasehi M, Pournaghshband M, Yekta BG. Dopaminergic system in CA1 modulates MK-801 induced anxiolytic-like responses. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 103 (2012) 102–110.

Zavialov AV, Engström A. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. *Biochem J*. 2005; 391: 51-57.