

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

KELLY JULIANA SEIBT

**INFLUÊNCIA DE FÁRMACOS ANTIPSICÓTICOS SOBRE A HIDRÓLISE
DE NUCLEOTÍDEOS EXTRACELULARES E ACETILCOLINA EM
CÉREBRO DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Porto Alegre

2008

KELLY JULIANA SEIBT

**INFLUÊNCIA DE FÁRMACOS ANTIPSICÓTICOS SOBRE A HIDRÓLISE DE
NUCLEOTÍDEOS EXTRACELULARES E ACETILCOLINA EM CÉREBRO
DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

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

Orientadora: Prof. Dra. Carla Denise Bonan

Porto Alegre

2008

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, que sempre me apoiaram nas minhas decisões. Muito obrigada pelo carinho, amor e principalmente por acreditar em mim. Amo vocês.

Ao meu namorado Luis Felipe, que esteve sempre presente me apoiando e incentivando. Muito obrigada pelo amor, carinho, incentivo, compreensão e paciência.

A minha orientadora Dra. Carla Bonan por quem tenho enorme admiração e carinho. Por mais que realmente eu deseje expressar em palavras o quanto sou grata por tudo que você fez e faz por mim, é muito difícil. Agradeço pelos ensinamentos, dedicação, confiança, carinho, incentivo e principalmente pela sua amizade. Obrigada pelas oportunidades que você me proporcionou.

Ao professor doutor Renato Dutra Dias, excelente exemplo de profissional, por inúmeros incentivos e ensinamentos.

Aos professores doutores Mauricio Bogo e Rosane Silva por toda a contribuição no meu trabalho e pela amizade.

A bolsista de iniciação científica e amiga Renata, pela responsabilidade, disponibilidade e dedicação com os quais se envolveu no trabalho.

Aos colegas de laboratório: Bibi, Rico, Denis, Fernanda, Katu, Mario, Caberlon pelo auxílio prestado, pelos momentos de aprendizado, pela descontração, enfim, pela amizade. Muito obrigada.

RESUMO

O zebrafish é um pequeno teleósteo que vem sendo considerado um modelo ideal para estudos de numerosas doenças humanas. O genoma desta espécie está quase todo sequenciado e estudos demonstraram que muitos genes deste peixe são similares ao de mamíferos, inclusive humanos. A esquizofrenia é uma grave síndrome neuropsiquiátrica que acomete em torno de 1% da população mundial. O uso de fármacos antipsicóticos é a base dos tratamentos para esquizofrenia. Evidências têm demonstrado o importante papel desempenhado pelo ATP e a adenosina no sistema nervoso central (SNC). O neurotransmissor ATP é armazenado de forma vesicular e liberado na fenda sináptica, onde pode agir em receptores específicos localizados na membrana celular. A inativação do sinal mediado pelo ATP extracelular é realizada por uma família de enzimas denominadas ectonucleotidases, incluindo as NTPDases (nucleosídeo trifosfato difosfoidrolases) e a ecto-5'-nucleotidase. Estas enzimas são responsáveis pelo catabolismo extracelular do neurotransmissor ATP até adenosina. Estudos do nosso laboratório demonstraram a presença de ectonucleotidases como as NTPDases e a ecto-5'-nucleotidase no SNC de zebrafish. A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor secretado pelos nervos colinérgicos terminais, juntamente com o ATP. Após exercer seu sinal nos receptores nicotínicos e muscarínicos, a ACh é inativada pela ação de uma enzima denominada acetilcolinesterase (AChE), que hidrolisa a ACh até colina e acetato. O gene da AChE já foi clonado e sequenciado e esta atividade enzimática foi detectada em cérebro de zebrafish. Considerando que: (1) o zebrafish é um importante modelo experimental em estudos farmacológicos, bioquímicos e patológicos, e que (2) os sistemas purinérgico e colinérgico exercem um importante papel na sinalização no SNC e (3) receptores e enzimas envolvidos nestes sistemas de neurotransmissão já foram descritos nesta espécie, torna-se importante avaliar os efeitos das drogas antipsicóticas sobre enzimas envolvidas na hidrólise dos nucleotídeos de adenina e acetilcolina no SNC do zebrafish. O efeito *in vitro* de sulpirida, olanzapina e haloperidol foram avaliados na atividade da AChE. Todas as drogas promoveram inibição na atividade desta enzima. Já no estudo *in vivo* somente o haloperidol alterou a atividade da AChE, ativando a hidrólise de ACh e aumentando a expressão gênica da AChE. Foi avaliado o efeito *in vitro* das drogas antipsicóticas sobre a atividade das NTPDases em membranas cerebrais de zebrafish. As três drogas testadas foram capazes de alterar a atividade das NTPDases, sendo que o haloperidol inibiu a hidrólise de ATP e ADP, a sulpirida inibiu a hidrólise de ADP e a olanzapina inibiu a hidrólise de ATP. Entretanto, nenhuma das três drogas testadas promoveu alteração significativa na atividade da ecto-5'-nucleotidase. Os resultados demonstram que os fármacos antipsicóticos podem influenciar na atividade das enzimas envolvidas na degradação dos neurotransmissores ATP e acetilcolina, sugerindo que o sistema purinérgico e colinérgico podem ser alvo dos efeitos neuroquímicos promovidos por estes fármacos.

Palavras chaves: esquizofrenia, antipsicóticos, acetilcolinesterase, ectonucleotidases, adenosina.

ABSTRACT

Zebrafish is a small teleost considered an ideal model for studies of several human diseases. The genome of this specie has been partially sequenced and studies have shown several genes of this fish are similar to mammals, including humans. Schizophrenia is a serious neuropsychiatric syndrome that attains around 1% of world population. The use of antipsychotic drugs is the base for schizophrenia treatment. Evidence has shown the important role of ATP and adenosine in the central nervous system (CNS). The neurotransmitter ATP is stored in a vesicular manner and released in the synaptic cleft, where can act in specific receptors located in the cell membrane. The inactivation of signaling mediated by extracellular ATP is promoted by a family of enzymes named ectonucleotidases, which includes NTPDases (nucleoside triphosphate diphosphohydrolases) and the ecto-5'-nucleotidase. These enzymes are responsible for the extracellular catabolism of neurotransmitter ATP to adenosine. Studies from our laboratory have shown the presence of ectonucleotidases, such as NTPDases and ecto-5'-nucleotidase in CNS of zebrafish. Acetylcholine (ACh) is a neurotransmitter secreted by cholinergic nerve terminals together with ATP. After exerting its signal in nicotinic and muscarinic receptors, ACh is inactivated by the action of an enzyme named acetylcholinesterase (AChE), which hydrolyzes ACh to choline and acetate. The gene of AChE is already cloned and sequenced and this enzyme activity was detected in zebrafish brain. Considering that: (1) zebrafish is an important experimental model in pharmacological, biochemical, and pathological studies and (2) cholinergic and purinergic systems exert an important role in the CNS signaling and (3) receptors and enzymes involved in these neurotransmitter systems have been already described in this specie, it become important to evaluate the effects of antipsychotic drugs on enzymes involved in adenine nucleotide and acetylcholine hydrolysis in CNS from zebrafish. The *in vitro* effect of sulpiride, olanzapine, and haloperidol on AChE activity was evaluated. All the drugs inhibited this enzyme activity. In the *in vivo* study, haloperidol altered the AChE activity, activating ACh hydrolysis and increasing gene expression of AChE. It has been evaluated the *in vitro* effect of antipsychotic drugs on NTPDase activities in brain membranes of zebrafish. The three tested drugs were able to alter the NTPDase activities. Haloperidol inhibited the ATP and ADP hydrolysis, sulpiride inhibited ADP hydrolysis and olanzapine inhibited ATP hydrolysis. However, none promoted significant alteration on ecto-5'-nucleotidase activity. The results have shown that antipsychotics can influence the enzyme activities involved in the degradation of neurotransmitter ATP and acetylcholine, suggesting that purinergic and cholinergic systems can be a target of neurochemical effects promoted by these drugs.

Keywords: schizophrenia, antipsychotics, acetylcholinesterase, ectonucleotidases, adenosine.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – acetilcolina

AChE – acetilcolinesterase

ADP - adenosina 5' - difosfato

AMP - adenosina 5' - monofosfato

AMPC- adenosina 5' - monofosfato cíclico

ATP - adenosina 5' - trifosfato

BuChE - butirilcolinesterase

Ca⁺² - cálcio

CHAT – colina acetiltransferase

CD73 – proteína de superfície de linfócitos

Cl⁻ - cloro

E-NPP - ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase

EPS – efeitos extrapiramidais

GABA - ácido γ -amino butírico

GMP - guanosina 5' - monofosfato

GPI – glicosilfosfatidilinositol

5-HT – serotonina

K⁺ - potássio

K_M - constante de Michaelis

Mg⁺² - magnésio

MK-801 – maleato de dizocilpina

mRNA – RNA mensageiro

Na⁺ - sódio

NMDA - N-metil-D-aspartato

NTPDase - nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

PKC – proteína cinase C

PKA - proteína cinase dependente de AMP cíclico

SNC - sistema nervoso central

SNP – sistema nervoso periférico

UTP – uridina 5'-trifosfato

UDP – uridina 5'- difosfato

UMP – uridina 5'-monofosfato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....	1
Figura 2: Estrutura química dos fármacos antipsicóticos.	10
Figura 4: Estruturas moleculares da acetilcolinesterase (AChE).....	12
Figura 5: Representação esquemática do modelo de hipofunção adenossinérgica.....	22

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
LISTA DE ABREVIATURAS	III
LISTA DE FIGURAS	V
1. CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.1.1 ZEBRAFISH (DANIO RERIO)	1
1.1.2 ESQUIZOFRENIA E FÁRMACOS ANTIPSICÓTICOS	4
1.1.3 SINALIZAÇÃO COLINÉRGICA	8
1.1.3.1 Acetilcolinesterase (E.C.3.1.1.7)	11
1.1.4 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA.....	15
1.1.4.1 Ectonucleotidasas	18
1.1.3.2 Sistema Purinérgico, esquizofrenia e fármacos antipsicóticos	21
1.2 OBJETIVOS	25
1.2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
2. CAPÍTULO 2	26
3. CAPÍTULO 3	33
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
5. CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Zebrafish (*Danio rerio*)

O zebrafish ou peixe-zebra é um pequeno teleósteo (3-4cm) de água doce, da família Cyprinidae, que vem sendo considerado um modelo ideal para estudos de numerosas doenças humanas (SLOMAN et al., 2003; BEST & ALDERTON, 2008). O número de pesquisas publicadas desenvolvidas a partir deste modelo animal tem aumentado consideravelmente a cada ano, pois o zebrafish tem sido utilizado como uma importante ferramenta para a realização de estudos envolvendo biologia do desenvolvimento, toxicologia, pesquisa transgênica, evolução do genoma vertebrado, teratologia e neurociências (IVETAC et al., 2000). O uso do zebrafish como um modelo para pesquisa possui diversas características favoráveis, tais como: baixo custo, requer pouco espaço para manutenção, rápido desenvolvimento e ciclo biológico, fácil manipulação, seu comportamento pode ser facilmente observado e quantificado em um ambiente controlado (SLOMAN et al., 2003), e ainda, seu pequeno tamanho, a sensibilidade para drogas, e o rápido metabolismo (KARLOVICH et al., 1998; GOLDSMITH, 2004).



Figura 1: Zebrafish (*Danio rerio*)

Nos últimos anos, houve um progresso considerável na genética e genômica do zebrafish (POSTLETHWAIT et al., 2000). Em 2001, o Instituto Sanger começou o

sequenciamento do genoma desta espécie (STERN & ZON 2003). A sequência do genoma mitocondrial já é conhecida, servindo de base para estudos filogenéticos (BROUGHTON et al., 2001). O estudo do genoma do zebrafish pode servir como um complemento funcional para o projeto genoma humano, o qual produz enormes quantidades de sequências, mas carece de informações funcionais para a maioria dos genes identificados (DOOLEY & ZON, 2000). Além disso, os genes deste teleósteo são evolutivamente conservados e apresentam um alto grau de similaridade com os genes humanos e de camundongo (BARBAZUK et al., 2000; LISCHKE & CURRIE, 2007).

O interesse pelo zebrafish pode ser observado pelo vasto número de laboratórios que utilizam este teleósteo como modelo experimental em suas pesquisas (SPRAGUE et al., 2001) e pelo crescimento exponencial do número de estudos publicados que envolvem esta espécie (LIESCHKE & CURRIE, 2007). Foi criada uma rede de informações na web sobre o zebrafish, o ZFIN (<http://zfin.org>), na qual laboratórios do mundo inteiro podem depositar um grande número de informações sobre esta espécie (SPRAGUE et al., 2003). Além disso, existe um excelente manual de manutenção e controle das condições ideais para a criação deste teleósteo em laboratórios (WESTERFIELD, 2000).

Atualmente, a utilização do zebrafish vem sendo expandida para outras áreas do conhecimento, tais como bioquímica (TAYLOR et al., 2004), neurociências (EDWARDS & MICHEL, 2002), toxicologia (HILL et al., 2005), farmacologia (GOLDSMITH et al., 2004) e biologia do comportamento (GERLAI, 2003; GUO, 2004). Devido às suas peculiaridades reprodutivas e às suas características morfológicas e fisiológicas, esta espécie desperta o interesse pela oportunidade de acelerar o processo da descoberta de novas drogas (STERN & ZON, 2003). Este teleósteo é capaz de absorver de forma rápida

os compostos que são diretamente adicionados na água e acumulá-los em diferentes tecidos, principalmente no SNC (GROSELL & WOOD, 2002). Entre os estudos envolvendo aspectos toxicológicos, a exposição a diferentes contaminantes ambientais, tais como a 2,3,7,8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina (TCDD) (DONG et al., 2002; HILL et al., 2003), pesticidas carbamatos e organofosforados (SENGER et al., 2005), metanol (RICO et al., 2006), etanol (RICO et al., 2008) e metais pesados (SENGER et al., 2006; ROSEMBERG et al., 2007) já foi estudada no SNC de zebrafish.

Além disso, diversos estudos envolvendo o desenvolvimento de sistemas, órgãos e patologias vêm sendo realizados nesta espécie (ACKERMANN & PAW, 2003; BEST & ALDERTON, 2008). Comparando-se as sequências do genoma humano e de zebrafish, muitos genes como os do ciclo celular, supressores tumorais e oncogenes se mostram conservados (AMATRUDA et al., 2002). Já foram observados muitos tipos de neoplasias no zebrafish, as quais são semelhantes histologicamente e geneticamente com as de humanos, o que mostra que a biologia do câncer é muito similar nestes organismos (AMATRUDA et al., 2002; STERN & ZON, 2003).

Numerosos estudos avaliando características comportamentais do zebrafish estão sendo desenvolvidos (GUO, 2004; GERLAI et al., 2000). Alguns estudos observaram a importância do comportamento inato e adquirido em modelos de agressividade, sociabilidade e sua preferência por ambientes claros ou escuros (SERRA et al., 1999). Estudos envolvendo exposição crônica ao etanol têm sido realizados e os resultados corroboram a hipótese do zebrafish ser um excelente modelo vertebrado que mimetiza aspectos característicos do alcoolismo (GERLAI et al., 2006). Além disto, existe um amplo espectro de paradigmas comportamentais complexos já descritos para este vertebrado

(NINKOVIC & BALLY-CUIF, 2006). Giacomini e colaboradores (2006) estudaram os efeitos de antipsicóticos (olanzapina, flufenazina e o haloperidol) sobre parâmetros comportamentais, mostrando que essas drogas produzem alterações locomotoras em larvas de zebrafish (GIACOMINI et al., 2006).

Diferentes sistemas de neurotransmissão já foram identificados nesta espécie tais como: glutamatérgico (EDWARDS & MICHEL, 2002), colinérgico (BEHRA et al., 2002; CLEMENTE et al., 2004; ARENZANA et al., 2005), dopaminérgico (RYU et al., 2006), serotoninérgico (LILLESAAR et al., 2007), histaminérgico (KASLIN & PANULA, 2001), gabaérgico (KIM et al., 2004), purinérgico (KUCENAS et al., 2003; RICO et al., 2003).

1.1.2 Esquizofrenia e fármacos antipsicóticos

A esquizofrenia é uma grave síndrome neuropsiquiátrica, altamente incapacitante, que acomete em torno de 1% da população mundial (MAJ & SARTORIUS, 2005). Os sintomas surgem caracteristicamente entre os 15 e 25 anos, e a incidência é discretamente maior entre os homens (BUCHANAN & CARPENTER, 2005), sendo que nas mulheres os sintomas se manifestam em média cinco anos mais tarde (HAFNER et al., 1998). O risco de desenvolvimento da doença é maior quando há histórico familiar da doença, especialmente se há parentesco de primeiro grau ou mais de um membro da família afetado (KENDLER, 2000).

Os sintomas da esquizofrenia podem ser classificados como positivos, negativos ou cognitivos (LEWIS & LIEBERMAN, 2000). Dentre os sintomas positivos estão incluídos as alucinações (tipicamente as auditivas), delírios (tipicamente persecutórios ou de megalomania), e desorganização severa do pensamento e do discurso. Os sintomas negativos constituem um conjunto de déficits em várias dimensões, como afeto embotado,

apatia, anedonia e comportamento antissocial. Já os sintomas cognitivos incluem déficits de atenção e memória (DEAKIN & SIMPSON, 1997).

Os eventos que desencadeiam a doença propriamente dita não são totalmente conhecidos, mas parecem incluir processos maturativos do SNC como proliferação e migração de neurônios e glia, proliferação axonal e dendrítica, morte celular programada (apoptose), mielinização axonal, conexões sinápticas e, interações ambientais como doenças físicas ou trauma, estresse psicológico e abuso de substâncias (WEINBERGER, 1995; LIEBERMAN et al., 2001). Algumas teorias neuroquímicas foram propostas para a patologia da esquizofrenia. Essas teorias baseiam-se em alterações em sistemas de neurotransmissores, sendo os principais achados relacionados ao sistema dopaminérgico (LARUELLE & ABI-DARGHAM, 1999) e glutamatérgico (KRYSTAL et al., 2002).

O surgimento da psicofarmacoterapia no século passado representou uma verdadeira revolução na assistência àqueles que sofrem de transtornos mentais (MIYAMOTO et al., 2003). Os antipsicóticos são drogas utilizadas no tratamento de praticamente todas as formas de sintomas psicóticos. Os primeiros antipsicóticos introduzidos foram a clorpromazina e o haloperidol, e sua capacidade de alterar o curso e o prognóstico da doença, reduzindo a severidade e a recorrência dos sintomas, foram bem aceitos (ABI-DARGHAM & LARUELLE, 2005).

A ação dos antipsicóticos deve-se, principalmente, mas não exclusivamente, ao antagonismo de receptores D2. O bloqueio dos receptores de dopamina é responsável pelo efeito terapêutico dos antipsicóticos e também pelos efeitos colaterais (MELTZER, 2002). Em um primeiro momento, os efeitos adversos extrapiramidais (EPS) dos antipsicóticos surgiram como o principal obstáculo a seu uso, dificultando a tolerância e aderência ao

tratamento. Segundo a teoria dopaminérgica da esquizofrenia, os sintomas positivos seriam decorrentes de uma atividade excessiva de dopamina em receptores D2 no núcleo accumbens, enquanto os sintomas negativos seriam decorrentes de uma redução na ativação de receptores dopaminérgicos no córtex pré-frontal (KAPUR, 2004). De acordo com essa teoria, um fármaco antipsicótico ideal deveria reduzir a atividade dopaminérgica no núcleo accumbens, atenuando os sintomas positivos, mas intensificá-la no córtex pré-frontal, atenuando sintomas negativos (STRANGE, 2001; KAPUR, 2004). Outra via dopaminérgica projeta-se da substância negra para o estriado dorsal (caudato-putamen, nos núcleos da base), sendo integrante do “sistema extrapiramidal” (HEIMER, 2003). Os antipsicóticos, ao antagonizarem essa via, induzem os EPS, que são alterações motoras como bradicinesia e acatisia, constituindo a chamada “síndrome Parkinsoniana”. Após o tratamento prolongado, essas drogas também induzem a discinesia tardia, efeitos colaterais caracterizados por movimentos involuntários da face e das extremidades (BAPTISTA, 1999).

A indução dos EPS é uma característica tão marcante dos antipsicóticos típicos, chamados também de neurolépticos, que inicialmente, acreditava-se que era uma característica fundamental dos antipsicóticos (HIPPIUS, 1989). Assim, a clozapina foi retirada do mercado na década de 60, uma vez que essa droga não induzia EPS e ainda provocava outros efeitos colaterais, como exemplo agranulocitose e hipotensão (FITZSIMONS et al., 2005). Porém, outro estudo realizado em 1988 pelo grupo de Herbert Meltzer, observou que a Clozapina, ao contrário dos demais fármacos, atenuava os sintomas positivos sem ocasionar EPS. Além disso, este fármaco apresentava eficácia contra os sintomas negativos da esquizofrenia, com um perfil absolutamente “atípico” para

um antipsicótico (MELTZER et al., 1988; SHEN, 1999). A atipicidade destes antipsicóticos é atribuída, pelo menos em parte, às suas ações sobre o sistema serotoninérgico (5-HT₂). Sabe-se que a serotonina exerce uma influência regulatória sobre neurônios dopaminérgicos, inibindo tonicamente esta atividade nas vias mesolímbica e nigroestriatal, ou seja, inibindo a liberação de dopamina (GRUNDER et al., 2003; MELTZER et al., 2003).

Assim, substâncias como a Clozapina, que apresentam efeito terapêutico em doses que não induzem EPS, são atualmente classificadas como “antipsicóticos atípicos”. Os antipsicóticos atípicos ou também chamados de antipsicóticos de segunda geração apresentam baixa afinidade pelos receptores dopaminérgicos, interagindo com outras classes de receptores (muscarínicos, serotoninérgicos, alfa-adrenérgicos e histamínicos) (MARDER & VAN PUTTEN, 1995). Em contraposição, os antipsicóticos típicos ou neurolepticos são potentes antagonistas dos receptores D2 (WORREL et al., 2000). Os antipsicóticos atípicos apresentam inúmeras vantagens em relação aos antipsicóticos típicos, porém estes fármacos possuem um custo elevado, o que impede seu uso generalizado, especialmente em países de terceiro mundo (KAPUR & REMINGTON, 2001; TAUSCHER et al., 2004).

No presente estudo foram analisados três diferentes fármacos antipsicóticos, sendo eles o haloperidol, a olanzapina e a sulpirida (Figura 2). O haloperidol é um fármaco típico do grupo das butirofenonas. Tem suas indicações e eficácia bem documentadas e estudadas nos tratamentos agudos e de manutenção dos quadros de doenças mentais, especialmente a esquizofrenia. O haloperidol é um antagonista dopaminérgico, atuando especialmente em

receptores D2. Como ocorre com todos os neurolépticos tradicionais, seu principal efeito colateral é a produção de EPS (ABI-DARGHAM & LARUELLE, 2005).

A sulpirida é um antipsicótico da classe das benzamidas, atuando principalmente sobre os receptores de dopamina D2 e D3, com menor potência que as butirofenonas, e também bloqueia os receptores histamínicos e muscarínicos (CACCIA, 2000; HUANG et al., 2007).

A olanzapina pertence à classe dos tienobenzodiazepínicos e possui ação bloqueadora dopaminérgica não seletiva. Bloqueia os receptores D1, D2, D3 e D4, sendo bem menos potente do que o haloperidol em bloquear os receptores D2 (BYMASTER, 1996). Além disso, bloqueia também receptores serotoninérgicos, muscarínicos, α -adrenérgicos e histamínicos. Devido ao perfil mais amplo de ação da olanzapina em relação aos antipsicóticos típicos, esta apresenta melhor eficácia no tratamento dos sintomas negativos dos transtornos psicóticos e apresenta menores efeitos colaterais (TRAN et al., 1997; MORTIMER, 2004).

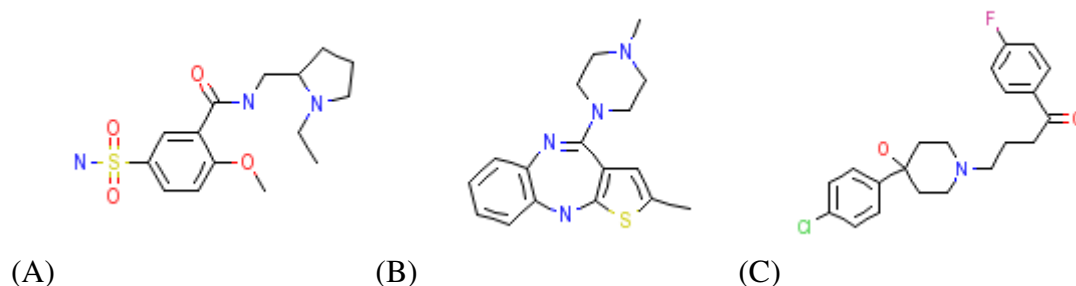


Figura 2: Estrutura química dos fármacos antipsicóticos, (A) Sulpirida; (B) Olanzapina; (C) Haloperidol.

1.1.3 Sinalização Colinérgica

O sistema colinérgico tem um papel fundamental em várias funções vitais (MESULAM et al., 2002), sendo a acetilcolina (ACh) o neurotransmissor mais importante

desse sistema (DESCARRIES et al., 1997). A ACh desempenha um papel fundamental no SNC e está relacionada ao comportamento, aprendizado, memória, organização cortical do movimento e controle do fluxo sanguíneo cerebral (MESULAM et al., 2002; MORETTO et al., 2004). Além de sua ação neurotransmissora, a ACh possui função neuromoduladora, pois os níveis da mesma podem regular a concentração de outros neurotransmissores no cérebro (COOPER et al., 1991).

A síntese da ACh ocorre a partir de Acetil CoA, formada durante o metabolismo celular mitocondrial, e da colina, um importante produto do metabolismo dos lipídios. A etapa final da síntese da ACh ocorre no citoplasma, sendo o neurotransmissor transportado para o interior de vesículas sinápticas (KAPCZINSKI et al., 2000). A colina usada na síntese de ACh pode vir diretamente da reciclagem da ACh, que é hidrolisada pela AChE na fenda sináptica ou a partir da fosfatidilcolina. Essas duas fontes de colina são particularmente importantes para o SNC, porque a colina presente no plasma não ultrapassa a barreira hemato-encefálica (TAYLOR & BROWN, 1994).

A liberação de ACh depende das variações no potencial elétrico das membranas dos terminais nervosos e este processo é dependente da concentração de cálcio intracelular. Ao ser liberada, a ACh interage com receptores específicos causando despolarização e propagação do potencial de ação na célula pós-sináptica (ODA, 1999). Seus efeitos são mediados pela ativação de receptores nicotínicos e muscarínicos ((SOREQ & SEIDMAN, 2001; DESCARRIES et al., 1997). A estimulação dos receptores muscarínicos conduzirá à despolarização ou hiperpolarização da membrana e também é capaz de inibir a enzima adenilato ciclase e ativar a enzima fosfolipase C (COOPER et al., 1991).

Os receptores nicotínicos para a acetilcolina consistem de cinco subunidades designadas β , α , γ e δ , sendo que a subunidade α é expressa em duas formas. Estudos estruturais mostram que as subunidades estão arranjadas ao redor de uma cavidade central, com uma grande porção de proteína voltada para a superfície extracelular. A ACh se liga normalmente a subunidade α , produzindo mudanças conformacionais, que permitem a passagem principalmente de cátions. A dessensibilização do receptor aumenta quando o mesmo é fosforilado por proteína quinase dependente de AMPc, PKC ou tirosina quinase (COOPER et al., 1991; DIAZ-HERNANDEZ et al., 2002).

A ACh que permanece na fenda sináptica é hidrolisada por uma colinesterase específica em ácido acético e colina. Grande parte da colina resultante é captada pelo terminal do axônio colinérgico por um transportador de colina (CHT) e reutilizada na síntese de nova ACh (Figura 3) (MESULAM et al., 2002).

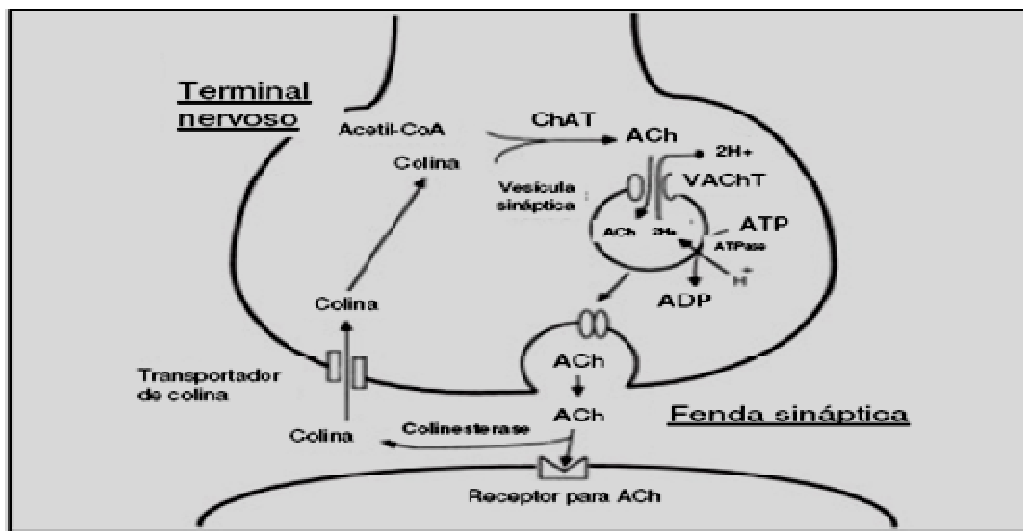


Figura 3: Esquema da sinapse colinérgica. A acetilcolina (ACh) que está contida na vesícula sináptica do terminal nervoso é liberada por exocitose. Liga-se no neurônio pós-sináptico através de receptores específicos e é hidrolisada por colinesterases específicas, que a degradam em colina e acetato. O transportador de colina recolhe a colina resultante da reação que está livre na fenda sináptica e a leva novamente para o neurônio pré-sináptico para reutilização. Colina-acetil-transferase (ChAT); transportador de acetilcolina vesicular (VACHT); adenosina 5'-trifosfato (ATP); adenosina 5'-difosfato (ADP) (Adaptado de ODA, 1999).

1.1.3.1 Acetilcolinesterase (E.C.3.1.1.7)

As colinesterases hidrolisam a ACh na fenda sináptica e desempenham um papel muito importante na neurotransmissão colinérgica, além de outras funções fisiológicas. São classificadas de acordo com suas propriedades catalíticas, especificidade de inibidores e distribuição nos tecidos: a AChE hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil, estando presente principalmente nas sinapses do SNC, SNP parassimpático e junção neuromuscular; e a butirilcolinesterase (E.C. 3.1.1.8, BuChe) hidrolisa outros tipos de ésteres como a butirilcolina. Ambas as colinesterases são amplamente distribuídas no organismo (TAYLOR & BROWN, 1999). A AChE é uma serina hidrolase que desempenha um papel essencial no mecanismo colinérgico, catalisando a hidrólise natural do substrato acetilcolina em acetato e colina (QUINN, 1987). A sequência de aminoácidos da AChE mostrou que serina, histidina e glutamato são resíduos importantes para a atividade catalítica (SUSSMAN et al., 1991). Os níveis de AChE parecem ser controlados pela interação da ACh com seus receptores, sendo que quando a interação é acentuada, aumentam os níveis de AChE. No entanto, a AChE pode ser usada como um marcador da função colinérgica, e mudanças na atividade da enzima podem indicar alterações na disponibilidade de ACh e do nível de seus receptores (FERNANDES & HODGES-SAVOLA, 1992).

A AChE é uma glicoproteína e sua forma estrutural divide-se em globular ou assimétrica. A forma globular é composta por monômeros (G_1), dímeros (G_2) e tetrâmeros (G_4) da subunidade catalítica. A unidade G_1 está ligada ao citosol, enquanto que G_4 à membrana da célula. O tipo G_4 é o mais observado no sistema nervoso e muscular (XIE et al., 2007). No sangue, predominam as formas G_2 (glóbulos vermelhos) e G_4 (plasma)

(SKAU, 1985). As formas homoméricas são encontradas como espécies solúveis na célula, provavelmente para a exportação, ou se apresentam associadas à membrana celular externa através de uma sequência de aminoácidos hidrofóbicos intrínsecos ou de um glicofosfolípídeo acoplado (TAYLOR & BROWN, 1999).

As formas heteroméricas da AChE estão associadas à lâmina basal externa por proteínas que determinam sua localização sináptica. Os tipos assimétricos consistem de um (A4), dois (A8) e três (A12) tetrâmeros catalíticos ligados ao colágeno Q (ColQ) que é predominante nas junções musculares. O tetrâmero ligado à âncora de membrana rica em prolina (PRIMA) é abundante nas sinapses cerebrais (Figura 4) (ZIMMERMAN & SOREQ, 2006).

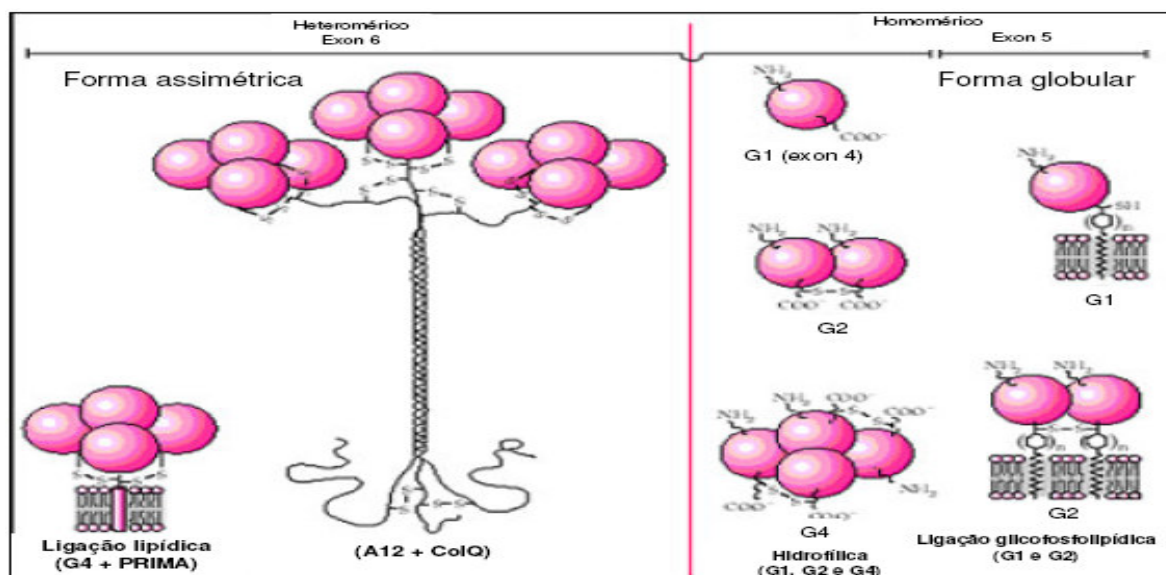


Figura 4: Estruturas moleculares da acetilcolinesterase (AChE). Estruturas globulares e assimétricas (adaptados de FELDMAN & QUENZER, 1984).

ARENZANA et al.(2005) estudaram o desenvolvimento do sistema colinérgico em cérebro e retina de zebrafish, sendo também mostrado através de análise histoquímica e imunohistoquímica em SNC desta espécie (CLEMENTE et al., 2004). O gene da AChE já foi clonado e sequenciado, e sua atividade enzimática já foi detectada no cérebro

(BERTRAND, et al., 2001). Este peixe apresenta uma única situação entre os vertebrados, pois a BuChE, responsável pela hidrólise de butirilcolina, não está presente no seu genoma. Além disso, subunidades de receptores muscarínicos e nicotínicos também são expressos nesta espécie (ZIRGER, et al., 2003).

1.1.3.2 Sistema Colinérgico, esquizofrenia e fármacos antipsicóticos

Evidências clínicas e experimentais mostram que o sistema dopaminérgico modula o sistema colinérgico em diferentes áreas do cérebro. Assim, a hipótese do balanço entre os sistemas dopaminérgicos e colinérgicos (LLOYD et al., 1973) tem sido usada para explicar a etiologia de várias desordens neuropsiquiátricas (UNDIE & FRIEDMAN, 1988).

Evidências mostraram que a dopamina tem um papel bem estabelecido na regulação da atividade motora, emoção, motivação e cognição. Um desequilíbrio nesse sistema está envolvido em diversas patologias, como a esquizofrenia, Parkinson e discinesia tardia (SPIELEWOY et al., 2000; JONES & PILOWSKY, 2002).

Os receptores de ACh estão amplamente distribuídos por todo o cérebro, incluindo o neocortex, hipocampo, tálamo e gânglios basais (CUMMINGS, 2000). Essas regiões fazem parte de vários circuitos neuronais relacionados a processos cognitivos. O sistema colinérgico tem sido implicado na regulação da atenção, memória, velocidade de processamento e filtro sensorial (BROOCKS et al., 1998; VITIELLO et al., 1997), processos esses que estão prejudicados na patologia da esquizofrenia.

Desta forma, diversas evidências mostram a importância de existir um balanço entre os sistemas de neurotransmissão dopaminérgica e colinérgica (BROWN & TAYLOR, 1996). Diferentes estudos têm mostrado que o sistema colinérgico pode estar alterado na

esquizofrenia. O estriado, região envolvida no controle motor extrapiramidal, possui uma alta concentração de ACh. O receptor muscarínico M4 e outros subtipos de receptores muscarínicos são coexpressos com receptores dopaminérgicos D1 e D2 nessa região (GOMEZA et al., 1999; GAO et al., 1997). O sistema extrapiramidal motor, por exemplo, depende do balanço entre dopamina e ACh, e um desequilíbrio nesse balanço provoca anormalidades motoras (TSUKADA et al., 2000).

Sob circunstâncias normais, a dopamina atua como um transmissor inibitório regulando a atividade de neurônios colinérgicos no neostriado. Drogas neurolépticas, como o haloperidol, reduzem o controle inibitório da dopamina na atividade neuronal colinérgica através do bloqueio de receptores dopaminérgicos, causando uma hiperatividade de neurônios colinérgicos, que transmitem, por sua vez, mensagens anormais ao tálamo e a outras áreas que controlam a função motora (USHIJIMA et al., 1997).

Estudos demonstraram que o haloperidol aumenta a atividade das enzimas colina acetiltransferase e da AChE no estriado e hipocampo de ratos após tratamento de 7-21 dias (MAHADIK et al., 1988). Outro estudo mostrou que antipsicóticos atípicos como clozapina, olanzapina, risperidona e ziprasidona aumentam significativamente a liberação de ACh no cortex pré-frontal de ratos, enquanto antipsicóticos típicos como haloperidol e tioridazina não alteraram. Nesse mesmo estudo, os autores mostraram que nenhuma das drogas antipsicóticas testadas foram capazes de alterar a liberação de ACh no núcleo accumbens ou estriado nas doses que foram eficazes no córtex pré-frontal (ICHIKAWA et al., 2002).

Conjuntamente, estes estudos sugerem que pessoas com esquizofrenia apresentam múltiplas anormalidades no sistema colinérgico e dopaminérgico, e que drogas que melhoram as funções colinérgicas, ou que conseguem manter um balanço favorável entre o sistema dopaminérgico e colinérgico, podem atuar melhorando as funções cognitivas que são comuns na patologia da esquizofrenia.

1.1.4 Sinalização Purinérgica

É amplamente reconhecido que a sinalização purinérgica é um sistema primitivo envolvido em muitos mecanismos neuronais e não neuronais e em eventos de curta e longa duração, incluindo respostas imunes, inflamação, dor, agregação plaquetária, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e morte celular (BURNSTOCK, 2004).

Os nucleosídeos e nucleotídeos exercem um papel de moléculas sinalizadoras extracelulares em vários tecidos, através dos receptores purinérgicos (BURNSTOCK & KNIGHT, 2004). Diversas evidências têm demonstrado o importante papel desempenhado por essas moléculas, entre elas o ATP (adenosina 5'-trifosfato) e a adenosina, no SNC (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998; DUNWIDDIE & MASINO, 2001).

O ATP é uma importante molécula sinalizadora no espaço extracelular e desempenha importantes papéis em condições fisiológicas e patológicas (ZIMMERMANN, 2001). O ATP é armazenado em vesículas pré-sinápticas e, após despolarização neuronal, é liberado atuando em receptores específicos na membrana pós-sináptica, sendo considerado um neurotransmissor (RAVELIC & BURNSTOCK, 1998). O ATP pode ser coliberado juntamente com vários outros neurotransmissores, como a acetilcolina, glutamato, noradrenalina, serotonina e ácido γ -amino butírico (GABA) (DI IORIO et al., 1998; BURNSTOCK, 2004).

O ATP exerce suas funções através da ativação de receptores purinérgicos do tipo P2. Este grupo de purinoreceptores é subdividido em duas famílias distintas: P2X e P2Y (RAVELIC & BURNSTOCK, 1998). A família P2X consiste em receptores ionotrópicos que apresentam permeabilidade rápida e seletiva para cátions (Na^+ , K^+ e Ca^{2+}), e está dividida em sete membros (P2X₁₋₇), distribuídos em neurônios, células gliais e no músculo liso (BURNSTOCK, 2004). A família P2Y consiste em receptores metabotrópicos e foram funcionalmente descritos oito membros (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ e P2Y₁₄) (BURNSTOCK, 2006). Esta sequência de números descontínuos se deve ao reconhecimento de que certos receptores foram erroneamente identificados como integrantes desta família, sendo então posteriormente retirados desta classificação (RAVELIC & BURNSTOCK, 1998). Os receptores P2Y apresentam uma ampla distribuição nos tecidos e sistemas, tais como: vascular, nervoso e cardíaco (BURNSTOCK, 2004). Dessa forma, dependendo do subtipo de receptor P2 e da via de sinalização envolvida, esses receptores podem desencadear e mediar processos de curto prazo (agudo) que afetam o metabolismo celular, neurotransmissão, neuromodulação, secreção endócrina e exócrina, agregação plaquetária e vasodilatação. Além disso, a sinalização purinérgica também provoca profundo impacto sobre outras respostas mais prolongadas, incluindo proliferação celular, diferenciação e apoptose (WEISMAN et al., 1998; BURNSTOCK & KNIGHT, 2004).

Uma vez liberado no espaço extracelular, o ATP pode ser metabolizado pela ação de ectoenzimas que fazem a conversão deste nucleotídeo até adenosina (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON et al., 2006). A adenosina não é descrita classicamente como neurotransmissor, pois não há indícios de que é armazenada em vesículas sinápticas, sendo

classificada como neuromodulador (AGRANOFF et al., 1999). A adenosina é um neuromodulador endógeno que influencia muitas funções do SNC (CUNHA, 2001), sendo reconhecida como um importante modulador da neurotransmissão excitatória e agente neuroprotetor em diferentes patologias relacionadas ao SNC, tais como na isquemia, hipóxia (FREDHOLM, 1997; RIBEIRO et al., 2003) e epilepsia (VIANNA et al., 2005). A concentração extracelular de adenosina é um fator determinante dos efeitos neuromoduladores desta molécula.

A adenosina exerce seus efeitos através da ativação de receptores de membrana específicos chamados de A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 , todos acoplados a proteína G e exibindo sete domínios transmembrana formados por aminoácidos hidrofóbicos (FREDHOLM et al., 2001; RIBEIRO et al., 2003). Os receptores A_1 e A_{2A} apresentam alta afinidade pela adenosina, enquanto os receptores A_{2B} e A_3 são de baixa afinidade (RIBEIRO et al., 2003).

Devido a este papel neuromodulador, a adenosina está envolvida na regulação de importantes mecanismos no SNC, como estados de ansiedade (EL YACOUBI et al., 2000), sono (PORKKA-HEISKANEN, 1999), cognição e memória (RIBEIRO et al., 2003). Além disso, este nucleosídeo apresenta especial importância nos estudos de diferentes patofisiologias, como na doença de Parkinson (FREDDUZZI et al., 2002) e na esquizofrenia (LARA et al., 2001).

Na sinalização purinérgica, existe um eficiente mecanismo de inativação, no qual ATP, ADP e AMP são hidrolisados a adenosina por uma cascata enzimática constituída pela via das ectonucleotidasas (RIBEIRO & SEBASTIÃO, 2000). Além de ser formada a partir da hidrólise do ATP através da ação dessas enzimas, a adenosina pode ser produzida no meio intracelular e transportada para o meio extracelular através de transportadores

específicos bidirecionais, que mantêm os níveis intracelulares e extracelulares de adenosina em equilíbrio. A adenosina extracelular também pode ser formada a partir da degradação do AMPc (LATINI & PEDATA, 2001).

A clonagem e caracterização molecular dos receptores P2X do zebrafish já foram realizadas (EGAN et al., 2000; DIAZ-HERNANDES et al., 2002). Kucenas e colaboradores (2003) mostraram que a subunidade P2X possui nove membros, sendo destes seis ortólogos à genes dos receptores P2X de mamíferos, dois parálogos e um gene ainda precisa ser devidamente classificado (KUCENA et al., 2003). Os subtipos dos receptores P2X do zebrafish contêm resíduos altamente conservados, os quais são encontrados nas subunidades de mamíferos. Até o momento, na família de receptores P2Y foram identificados oito proteínas funcionais (RALEVIC & BURSNTOCK, 1998; ILLES & RIBEIRO, 2004), e apenas foram identificados receptores P2Y₁ em trombócitos de zebrafish (GREGORY & JAGADEESWARAN, 2002).

1.1.4.1 Ectonucleotidases

Os nucleotídeos extracelulares são degradados por uma cascata de hidrólise extracelular que resulta na formação do respectivo nucleosídeo e fosfato livre (ZIMMERMANN, 2000). Esta cascata é realizada por uma variedade de enzimas que estão localizadas na superfície celular, chamadas de ectonucleotidases. As ectonucleotidases estão ancoradas na membrana celular, e seu sítio ativo está voltado para o meio extracelular, ou estão presentes na forma solúvel no meio intersticial. Estas enzimas são responsáveis pelo controle dos níveis extracelulares de ATP e adenosina (ZIMMERMANN, 2001).

Este conjunto de enzimas inclui a família das E-NPP (ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase), a família das NTPDases (nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase), as fosfatases alcalinas e a ecto-5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) (ROBSON et al., 2006). Neste trabalho, estudou-se a família das NTPDases (nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases) e a ecto-5'-nucleotidase (CD73, E.C.3.1.3.5).

As NTPDases realizam a hidrólise de nucleotídeos tri e difosfatados (ZIMMERMANN, 2001). Esta família de enzimas é composta por oito membros, sendo que quatro das NTPDases estão localizadas na superfície das células, com um sítio catalítico extracelular (NTPDases1, 2, 3, 8), as NTPDases5 e 6 apresentam localização intracelular e as NTPDases4 e 7 são enzimas intracelulares cujos centros ativos estão direcionados para o lúmen das organelas citoplasmáticas (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON et al., 2006). Em termos de hidrólise de nucleotídeos, a NTPDase1 hidrolisa ATP e ADP igualmente, sendo a proporção da hidrólise destes dois substratos de 1:1 (Heine et al., 1999). A enzima NTPDase2 hidrolisa 30 vezes mais ATP do que o ADP (Kirley et al., 1997). A NTPDase3 e a NTPDase8 preferem o ATP em relação ao ADP numa razão de hidrólise de aproximadamente 3:1 e 2:1, respectivamente (Chadwick et al., 1998; Bigonnesse et al., 2004). NTPDase4 α tem uma alta preferência por UTP e TTP, enquanto que a NTPDase4 β apresenta alta preferência por CTP e UDP. A função destas NTPDases ainda não é clara (Zimmermann, 2001). A NTPDase5 tem uma preferência na hidrólise de nucleotídeos na seguinte ordem: UDP>GDP = IDP>>ADP = CDP, enquanto que a NTPDase6 tem a seguinte preferência: GDP>IDP>>UDP = CDP>>ADP. Acredita-se que a NTPDase5 e a NTPDase6 participam das reações de glicosilação envolvidas nos processos de dobramento de glicoproteínas (Zimmermann, 2001). A NTPDase7 prefere

nucleosídeos trifosfatados como substratos (Zimmermann, 2001). Estas enzimas hidrolisam tanto ATP como ADP, formando AMP na presença de íons Ca^{+2} e Mg^{+2} (CHAN et al., 1986; ZIMMERMANN, 2001). O AMP formado é então convertido a adenosina pelas 5'-nucleotidase (ZIMMERMANN, 2001; ROBSON et al., 2006). A família das NTPDases tem modulado alguns processos de sinalização ou biossintéticos nos quais os nucleotídeos extracelulares desempenham um importante papel, incluindo a homeostase vascular, a manutenção do tamanho celular, a sinalização celular, a função imune e a modificação de proteínas e lipídeos (BRAKE & JULIUS, 1996; BURNSTOCK, 1998; GAYLE et al., 1998; MARCUS et al., 2003).

A ecto-5'-nucleotidase, também conhecida como a proteína linfocitária CD73 em associação à NTPDase, realiza a hidrólise do AMP até a produção de adenosina (ZIMMERMANN, 1992). Esta atividade enzimática é dependente de cátions divalentes, como cálcio e magnésio. A ecto-5'-nucleotidase é uma enzima ancorada à membrana plasmática por GPI, sendo que formas solúveis da enzima podem ser originadas mediante a ação de uma fosfolipase específica (ZIMMERMANN, 1992). Esta enzima encontra-se presente na maioria dos tecidos e sua principal função é a hidrólise de nucleosídeos monofosfatados extracelulares, tais como AMP, GMP ou UMP, a seus respectivos nucleosídeos, sendo o AMP o nucleotídeo hidrolisado com maior eficiência com valores de K_M na faixa de micromolar (ZIMMERMANN, 1996). O ATP e o ADP são inibidores competitivos da 5'-nucleotidase com valores de K_i também na faixa de micromolar (ZIMMERMANN, 1996). Em SNC, a ecto-5'-nucleotidase está predominantemente associada à glia, mas várias evidências têm demonstrado que esta atividade também está associada a neurônios (ZIMMERMANN, 1996; ZIMMERMANN et al., 1998;

ZIMMERMANN, 2001). A participação da ecto-5'-nucleotidase na via das ectonucleotidases exerce um papel modulador sobre a produção de adenosina extracelular, sendo a enzima marcapasso desta cascata enzimática (ZIMMERMANN, 1996; CUNHA, 2001).

Estudos do nosso laboratório demonstraram a presença de atividades NTPDásica e ecto-5'-nucleotidásica em membranas cerebrais de zebrafish. Estas duas enzimas foram caracterizadas como cátion-dependentes, apresentando atividade máxima à temperatura de 37 °C, pH ótimo entre 7,2 e 8,0, K_M na faixa do micromolar e uma ampla especificidade por outros nucleotídeos (RICO et al., 2003; SENGER et al., 2004).

1.1.3.2 Sistema Purinérgico, esquizofrenia e fármacos antipsicóticos

A adenosina tem ação moduladora sobre diversos sistemas neurotransmissores, entre eles o sistema glutamatérgico e dopaminérgico. Estudos mostraram que o neuromodulador adenosina contribui para a patofisiologia da esquizofrenia (LARA et al., 2006). Esta hipótese indica que uma disfunção na atividade adenosinérgica na esquizofrenia poderia levar a importantes alterações da atividade dopaminérgica e glutamatérgica (LARA et al., 2006). A proposta de disfunção adenosinérgica na esquizofrenia conduz a um déficit na sinapse adenosinérgica, e isso pode ocorrer devido a alterações nos receptores ou alteração no metabolismo, isto é, diminuição da produção/liberação ou aumento da degradação/captação da adenosina (LARA et al., 2006).

A interação entre o sistema purinérgico e dopaminérgico se deve à ação neuromoduladora da adenosina, devido ao envolvimento dos receptores A_1 e A_{2A} pré e pós-sinapse. A ação dos receptores A_1 pré-sinápticos modula a liberação de dopamina no estriado, assim, agonistas desses receptores inibem, enquanto antagonistas aumentam a

liberação de dopamina (SOLINAS et al., 2002; QUARTA et al., 2004). Os receptores D2 e A_{2A} estão colocalizados e interagem antagonicamente na membrana pós-sináptica, de maneira que a estimulação dos receptores A_{2A} diminui a afinidade dos receptores D2 pela dopamina. Assim, antagonistas A_{2A} bloqueiam a atividade da adenosina endógena e consequentemente aumentam a afinidade dos receptores D2 pela dopamina (FERRÉ, 1997). A partir dessas interações, pode-se dizer que uma diminuição da atividade adenosinérgica pode levar a um estado hiperdopaminérgico e hiper glutamatérgico, simultaneamente, além de outros efeitos independentes desses dois sistemas de neurotransmissão (Figura 5) (LARA & SOUZA, 2001).



Figura 5: Representação esquemática do modelo de hipofunção adenosinérgica e suas implicações para o sistema dopaminérgico e glutamatérgico e para o curso de esquizofrenia. Adaptado de Lara & Souza, 2001.

Os estudos envolvendo o sistema purinérgico na esquizofrenia ainda são escassos. Quanto ao metabolismo do sistema purinérgico, foi observado que a atividade da enzima serina hidroximetil transferase (SHMT), uma enzima responsável pela produção de adenosina a partir de glicina e grupos metileno, estava diminuída (menor afinidade pelo substrato) no lobo temporal de esquizofrênicos (WAZIRI et al., 1993). Também a atividade de ATPases, envolvidas no metabolismo do ATP até adenosina, foi encontrada diminuída

em membranas celulares de esquizofrênicos (RYBAKOWSKI & LEHMAN, 1994). Outra fonte de adenosina extracelular, o AMPc, apresentou concentrações inferiores no líquido de pacientes esquizofrênicos (GATTAZ et al., 1985). E ainda, estudos *post-mortem* mostraram um aumento em receptores A_{2A} estriatais em esquizofrênicos (KURUMAJI & TORU, 1998). Apesar do uso crônico de antipsicóticos típicos induzir aumento da expressão desses receptores em ratos (PARSONS et al., 1995), não houve diferença entre os pacientes que vinham com ou sem tratamento farmacológico anterior. Os autores interpretaram esse achado como um aumento compensatório desses receptores decorrente da hiperfunção dopaminérgica. No entanto, parece contraditório que tanto um estado hipodopaminérgico (induzido por antipsicóticos típicos) como hiperdopaminérgico (esquizofrenia) causem aumento da expressão de receptores A_{2A} . Portanto, Lara & Souza (2001), propuseram que esse resultado seria uma resposta compensatória à diminuição dos níveis de adenosina, que por sua vez produziriam ou contribuiriam para o estado hiperdopaminérgico.

Alguns estudos têm mostrado a relação dos fármacos antipsicóticos com o sistema adenosinérgico. Brunstein e colaboradores (2007) mostraram que, em soro de pacientes esquizofrênicos tratados com fármacos antipsicóticos, a atividade da enzima adenosina deaminase está aumentada, principalmente nos pacientes tratados com clozapina. Além disso, foi demonstrado um aumento da atividade da ecto-5'-nucleotidase em pacientes esquizofrênicos tratados com clozapina quando comparados com o grupo controle (BRUNSTEIN et al., 2007). Lara e colaboradores (2001) mostraram que o tratamento crônico (28 dias) com clozapina aumentou a atividade da ecto-5'-nucleotidase em estriado de ratos, já o tratamento crônico com haloperidol não apresentou diferença significativa na atividade da enzima.

Assim, Lara e colaboradores propuseram que tratamentos farmacológicos que aumentam a atividade de adenosina são efetivos quanto à redução de sintomas positivos em pacientes esquizofrênicos (LARA et al., 2001; 2006). Portanto, o estudo da interação entre o sistema purinérgico e fármacos antipsicóticos permitirá um maior entendimento sobre os efeitos neuroquímicos destes compostos em outros sistemas de neurotransmissão.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Considerando que: (1) o zebrafish é um importante modelo experimental em estudos farmacológicos, bioquímicos e patológicos, e que (2) os sistemas purinérgicos e colinérgicos exercem um importante papel na sinalização no SNC e (3) receptores e enzimas envolvidos nestes sistemas de neurotransmissão já foram descritos nesta espécie, o objetivo geral deste estudo foi avaliar os efeitos das drogas antipsicóticas sobre enzimas envolvidas na hidrólise dos nucleotídeos de adenina e acetilcolina no SNC do zebrafish.

1.2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste estudo são:

- Avaliar o efeito do tratamento *in vitro* com haloperidol, olanzapina e sulpirida sobre a atividade da acetilcolinesterase em homogenato cerebral de zebrafish;
- Avaliar o efeito do tratamento *in vivo* com haloperidol, olanzapina e sulpirida sobre a atividade da acetilcolinesterase em homogenato cerebral de zebrafish;
- Verificar a expressão gênica da acetilcolinesterase após o tratamento *in vivo* com os fármacos antipsicóticos;
- Avaliar o efeito do tratamento *in vitro* de drogas antipsicóticas, como o haloperidol, sulpirida e olanzapina sobre as atividades das NTPDases e da 5'-nucleotidase em membranas cerebrais do zebrafish.

2. CAPÍTULO 2

Typical and atypical antipsychotics alter acetylcholinesterase activity and *ache* expression in zebrafish (*Danio rerio*) brain

Kelly Juliana Seibt, Renata da Luz Oliveira, Eduardo Pacheco Rico, Renato Dutra Dias,
Mauricio Reis Bogo, Carla Denise Bonan

Artigo aceito para publicação no periódico Comparative Biochemistry and Physiology -
Part C – Toxicology & Pharmacology.



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C

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

Typical and atypical antipsychotics alter acetylcholinesterase activity and *ache* expression in zebrafish (*Danio rerio*) brain

Kelly Juliana Seibt^a, Renata da Luz Oliveira^a, Eduardo Pacheco Rico^{a,b}, Renato Dutra Dias^a,
Mauricio Reis Bogo^{c,*}, Carla Denise Bonan^{a,*}

^a Neuroquímica e Psicofarmacologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2008

Received in revised form 16 January 2009

Accepted 16 January 2009

Available online xxx

Keywords:

Acetylcholinesterase

Antipsychotics

Haloperidol

Olanzapine

Sulpiride

Zebrafish

ABSTRACT

Antipsychotic agents are widely used for the treatment of psychotic symptoms in patients with several brain disorders. Antipsychotic drugs principally affect dopamine systems with the newer ones also affecting serotonin, norepinephrine, and histamine systems. Other transmitter systems can be involved with selected antipsychotic drugs but effects on cholinergic system are less known. Considerable evidence has shown that complex interactions between dopaminergic and cholinergic systems are critical for the proper regulation of motor control and memory. These neurotransmitter systems have been studied in zebrafish, which has recently become a focus of neurobehavioral studies. Therefore, we have evaluated the *in vitro* and *in vivo* effects of sulpiride, olanzapine, and haloperidol on acetylcholinesterase activity and *ache* expression pattern in zebrafish brain. For *in vitro* studies, all drugs were able to promote a decrease on acetylcholinesterase activity. For *in vivo* studies, olanzapine and sulpiride exposure did not change acetylcholinesterase activity. In contrast, this enzyme activity was significantly increased at 5 and 9 μ M haloperidol (29.9% and 20.4%, respectively). Haloperidol exposure was able to increase acetylcholinesterase mRNA transcripts. These findings have suggested that the alterations in zebrafish acetylcholinesterase could reveal molecular mechanisms related to cholinergic signaling induced by antipsychotic treatment.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Antipsychotic agents have been increasingly used for treatment of psychotic symptoms and agitation in patients with a variety of brain disorders, such as schizophrenia, bipolar disorder, Alzheimer's disease, and traumatic head injury (Bascunana et al., 2000; Daniel, 2000). Long-term treatment with some of these drugs may be associated with the development of a wide range of undesired effects, including debilitating extrapyramidal symptoms and cognitive dysfunction. The different therapeutic actions and side-effect profiles for typical and atypical antipsychotics have been explained based on preferential actions at specific receptors (Kinon and Lieberman, 1996; Richelson and Souder, 2000). Typical antipsychotics, such as haloperidol, act preferentially via dopamine D2 receptor blockade (Heusler et al., 2008). Atypical antipsychotics, such as olanzapine, cause less extrapyramidal symptoms than standard antipsychotics and have been classified based on less selective activity across several neurotransmitter receptors (moderately

potent 5HT₂ receptor antagonists with lesser and equal potency for dopamine D1, D2, and α_1 -adrenergic receptors) (Wadenberg et al., 2001; Seeman, 2002). Sulpiride, another atypical antipsychotic, acts preferentially via D2 and D3 dopamine receptor blockade (Jaworski et al., 2001; Elisabetsky and Costa-Campos, 2006).

Although neuropsychiatric and neurodegenerative diseases have been attributed to deficits within a single neurotransmitter system, disease progression might be related to the deficit of the initially affected system to modulate or be modulated by other neurotransmitters. The extrapyramidal motor system, for example, relies on a balance between dopamine and acetylcholine, and disruption in the balance results in motor abnormalities in monkey brain (Tsukada et al., 2000). Acetylcholine plays an important role in motor functions and various domains of cognition, attention (Perry et al., 1999), and working memory (Winkler et al., 1995). Studies have been shown that acute administration of D2 dopaminergic agonist inhibits acetylcholine release in striatum whereas D1 agonist administration increases its release in rats (Bertorelli and Consolo, 1990). Furthermore, in the striatum, a region known to be critically involved in extrapyramidal motor control, the M4 as well as other muscarinic receptor subtypes are coexpressed with D1 and D2 dopamine receptors on mice striatal projection neurons (Gomez et al.,

* Corresponding authors. Tel.: +55 51 3320 3500x4158; fax: +55 51 3320 3568.
E-mail addresses: mbogo@puccrs.br (M.R. Bogo), cbonan@puccrs.br (C.D. Bonan).

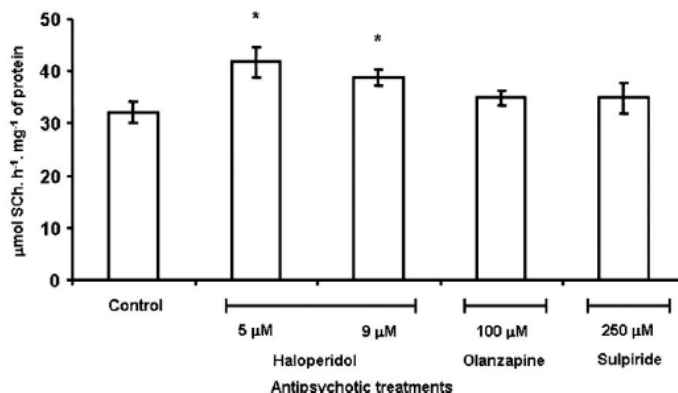


Fig. 1. Effect *in vivo* of haloperidol (5 and 9 μM), olanzapine (100 μM), and sulpiride (250 μM) on acetylcholinesterase activity in zebrafish brain. Data represent means \pm S.D. of four different experiments, each one performed in triplicate. The symbol (*) indicates difference when compared to the control group. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey test as post-hoc test, considering a $P < 0.05$ significant.

1999). Studies have also shown a possible participation of nicotinic acetylcholine receptors in midbrain dopaminergic nuclei in mice, which may modulate reinforcement and motor behavior in different manners and may be involved in drug addiction, schizophrenia, and Parkinson's disease (Zhou et al., 2001). It has been shown that nicotine enhances cognitive functioning in zebrafish by modulating the release of dopamine in the brain or by changing the rate at which dopamine is metabolized (Eddins et al., *in press*). Zebrafish express functional β_3 , α_2 , and α_7 nicotinic receptors and these receptors show a high degree of similarity with mammalian nicotinic receptors (Zirger et al., 2003). Proteins necessary for dopaminergic signaling have been detected in the zebrafish brain of which includes tyrosine hydroxylase and dopamine transporters (Holzschuh et al., 2001). Zebrafish also express functional D1, D2, D3, and D4 dopaminergic receptors (Boehmler et al., 2007). This demonstrates that even though there are structural differences between the zebrafish and the rodent brain, similar signaling mechanisms are important for mediating behavior.

Acetylcholine is synthesized by choline acetyltransferase, then secreted from the presynaptic nerve terminal and bound to acetylcholine receptors, which are clustered in the postsynaptic membrane. After its release, it is rapidly metabolized from the synaptic cleft by acetylcholinesterase, which belongs to the family of type B carboxylesterases and cleaves acetylcholine into choline and acetate (Soreq and Seidman, 2001). Two different types of cholinesterases are able to hydrolyze acetylcholine: acetylcholinesterase (EC.3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (EC.3.1.1.8). Haloperidol has been observed to increase choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities in the rat striatum and hippocampus after short-term treatment (7–21 days). However, after long-term treatment (+40 days), there is a decrease only on choline acetyltransferase activity and immunoreactivity, as indicated by an apparent reduction in the size and number of stained neurons and their processes (Mahadik et al., 1988).

Zebrafish have recently become a focus of neurobehavioral studies since display learning, sleep, conditioned place preference to several drugs, as amphetamine, cocaine, and opiates (Darland and Dowling, 2001; Guo, 2004; Ninkovic and Bally-Cuif, 2006; Bretau et al., 2007). However, reduced complexity of the zebrafish brain is a limitation to establish comparisons between this specie and human. Butyrylcholinesterase was not found in zebrafish genome and acetylcholinesterase is encoded by a single gene that was already cloned, sequenced and functionally detected in zebrafish brain (Clemente et al., 2004). This species also holds a great potential for our understanding of the genetic basis of behavior and associated behavioral disorders (Amsterdam and Hopkins, 2006; Krens et al., 2006), because zebrafish has shown

genetic conservation with both mice and humans (Dooley and Zon, 2000). Fluphenazine and haloperidol, characterized for inducing severe extrapyramidal symptoms in humans, might promote movement defects in zebrafish treated with these drugs (Giacomini et al., 2006).

Considering that zebrafish may be an relevant vertebrate model system for numerous human diseases and that cholinergic and dopaminergic systems have been described in zebrafish brain, the aim of this study is to evaluate the *in vitro* and *in vivo* effects of different concentrations of haloperidol, sulpiride, and olanzapine on acetylcholinesterase activity from zebrafish brain followed by a gene expression pattern analysis.

2. Methods

2.1. Animals

Adult zebrafish (*Danio rerio*; age around 2–3 months) of both sexes were obtained from a commercial supplier (Delphis, RS, Brazil) and acclimated for at least 2 weeks in a 50-L aquarium. The fish were kept on a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 h) at a temperature of 25 ± 2 °C. They were used according to the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals, being healthy and free of any signs of disease. The Ethics Committee of Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) approved the protocol under the number 014/08 – CEUA. The experiments were performed between 8:00 h and 13:00 h.

2.2. Chemicals

Haloperidol, olanzapine, sulpiride, Trizma Base, ethylenedioxydiethylene-dinitrilo-tetraacetic acid (EDTA), ethylene glycol bis(beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), sodium citrate, Coomassie Blue G, bovine serum albumin, acetylthiocholine, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). All other reagents used were from analytical grade.

2.3. *In vivo* treatments

For *in vivo* assay, five fish were kept in 1-L aquariums and exposed to water with haloperidol (5 and 9 μM), olanzapine (100 μM), and sulpiride (250 μM). The animals were maintained in the test aquarium during 2 h and, immediately after the exposure, the fish were euthanized. The drug solutions were changed for each experiment. For the control group, the

animals were exposed only to water in a test aquarium during 2 h and, after this time period the fish were euthanized. The haloperidol dose and time of treatment *in vivo* were chosen based on previous studies with zebrafish (Giacomini et al., 2006). The other concentrations of antipsychotic agents used in this study were chosen based on drug potencies observed in human (McClelland et al., 1990; Kiang et al., 2003) and rat (Ichikawa et al., 1998; Parikh et al., 2004) studies.

2.4. *In vitro* treatments

For the *in vitro* assays, haloperidol, olanzapine, and sulpiride at the final concentrations of 1, 10, 50, 100, and 250 μM were added to reaction medium (described below), pre-incubated for 10 min with the homogenized and maintained throughout the enzyme assay. For the control group, the enzyme assay was performed in the absence of antipsychotics (no drug added in the reaction medium).

2.5. Determination of AChE activity

Zebrafish were euthanized by decapitation, their brains were removed from the cranial skull by the dissection technique. A pool of five total brains of zebrafish was used for each experiment. The brains were homogenized on ice in 60 vol (v/w) of Tris-citrate buffer (50 mM Tris, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, pH 7.4, with citric acid) in a motor driven Teflon-glass homogenizer. The rate of acetylthiocholine hydrolysis (0.8 mM) was determined in a final volume of 2 ml with 100 mM phosphate buffer, pH 7.5, and 1.0 mM DTNB using a method previously described (Ellman et al., 1961). Before the addition of substrate, samples containing protein (10 μg) and the reaction medium described above were preincubated for 10 min at 25 °C. Thiocholine released because the cleavage of acetylthiocholine by acetylcholinesterase is allowed to react with the -SH reagent DTNB, which is a reduced to

thionitrobenzoic acid, a yellow coloured anion with absorption maxima at 412 nm for 2–3 min (30-second intervals). Controls without the homogenate preparation were performed in order to determine the non-enzymatic hydrolysis of acetylthiocholine. The linearity of absorbance related to time and protein concentration was previously determined. Acetylcholinesterase activity was expressed as micromole of thiocholine (SCh) released per hour per milligram of protein. Four different experiments were performed and the assays were run in triplicate.

2.6. Protein determination

Protein was measured using Coomassie Blue as color reagent and bovine serum albumin as standard (Bradford, 1976).

2.7. Molecular analysis

Forward (5'-CCAAAAGAATAGAGATGCCATGGACG-3') and reverse (5'-TGATGATGTTAAGCAGACGAGGCAGG-3') *ache* primers and optimal conditions for RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) were used according to Rico et al. (2006). The β -actin primers forward (5'-GTCCTGTACGCTCTGGTCG-3') and reverse (5'-GCCGACTCATCGTACTCTG-3') were used as described previously (Chen et al., 2004).

Immediately after *in vivo* treatment with haloperidol (described above), the animals were euthanized by decapitation, their brains were removed from the cranial skull by the dissection technique. For each sample, a pool of five zebrafish brains was used. Total RNA was isolated from zebrafish brain using TRIzol reagent (Invitrogen) in accordance with manufacturer instructions. RNA was quantified by spectrophotometer and all samples were adjusted to 160 ng/ μL . cDNA species were synthesized using SuperScript III™ First-Strand (Synthesis System for RT-PCR) Invitrogen Kit following the supplier instructions. One microliter of RT reaction mix was used as a template for each PCR. PCR for *ache* was performed in a total volume of 25 μL using 0.08 μM of each primer, 0.2 μM dNTP (Deoxyribonucleotide triphosphate), 2 mM MgCl_2 and 1U Taq DNA polymerase (Invitrogen). PCR for β -actin gene was performed in 20 μL using 0.1 μM of each primer, 0.2 μM dNTP, 2 mM MgCl_2 and 0.5U Taq DNA polymerase (Invitrogen). PCR were conducted at 1 min at 94 °C, 1 min at 60 °C (*ache*) and at 54 °C (β -actin), and 1 min at 72 °C for 35 cycles. A post-extension cycle was performed for 10 min at 72 °C. For each PCR set, a negative control was included. PCR products were analyzed on 1% agarose gel, containing GelRed® and visualized with ultraviolet light. The low DNA Mass Ladder (Invitrogen) was used as a molecular marker and normalization was performed employing β -actin as a constitutive gene. The band intensities were measured by optical densitometry analysis and the enzyme/ β -actin mRNA ratios were established for each treatment using the Kodak 1D Image Analysis Software.

2.8. Statistical analysis

Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) and expressed as means \pm S.D. A Tukey multiple test range as post-hoc was performed considering a significance level of 5%.

3. Results

The *in vivo* effect of acute antipsychotic treatment has been also demonstrated on zebrafish acetylcholinesterase. The experiments have been performed after a 2 h-exposure to sulpiride (250 μM), olanzapine (100 μM), and haloperidol (5 and 9 μM). Olanzapine and sulpiride did not promote a significant difference on acetylcholinesterase activity in zebrafish brain. However, this enzyme activity has been significantly increased at 5 and 9 μM haloperidol (29.9% and 20.4%, respectively) when compared to the control group (Fig. 1). These effects are in agreement with previous studies showing that

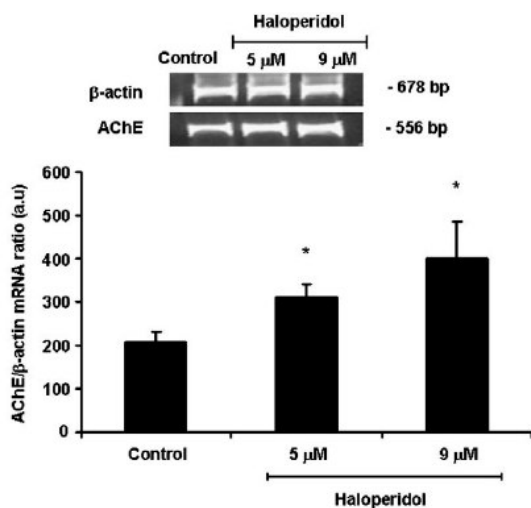


Fig. 2. Acetylcholinesterase and β -actin mRNA expression in adult zebrafish brain. Fish were exposed to haloperidol concentrations (5 and 9 μM), the brains were excised and RT-PCR experiments were conducted. The PCR products were subjected to electrophoresis on a 1% agarose gel, using β -actin as constitutive gene. The figure shows a representative gel and the *ache*/ β -actin mRNA ratio (expressed as arbitrary units) obtained by optical densitometry analysis of three independent experiments, with entirely consistent results. The symbol (*) indicates difference when compared to the control group. The data were expressed as means \pm S.D. and analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey test as post-hoc test, considering a $P < 0.05$ significant.

Please cite this article as: Seibt, K.J., et al., Typical and atypical antipsychotics alter acetylcholinesterase activity and AChE expression in zebrafish (*Danio rerio*) brain, Comp. Biochem. Physiol. C (2009), doi:10.1016/j.cbpc.2009.01.008

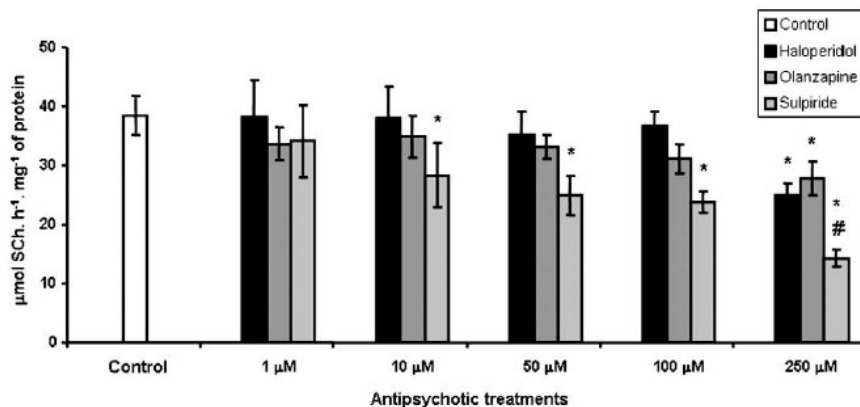


Fig. 3. Effect *in vitro* of different concentrations of sulpiride, haloperidol, and olanzapine on acetylcholinesterase activity in zebrafish brain. Data represent means \pm S.D. of four different experiments, each one performed in triplicate. The symbol (*) indicates difference when compared to the control group, whereas (#) represents a significant difference when compared to other sulpiride treatments. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA followed by Tukey test as post-hoc test, considering a $P < 0.05$ significant.

haloperidol-treated fish exhibited significant erratic movements whereas olanzapine had minimal such effect (Giacomini et al., 2006).

The increase of acetylthiocholine hydrolysis promoted by haloperidol exposure could be a consequence of transcriptional control and/or post-translational regulation. RT-PCR analyses have been performed when kinetic alterations have been observed. The results have demonstrated that the relative amount of acetylcholinesterase mRNA has been significantly increased (48% and 91%) after treatment with 5 and 9 μ M haloperidol, respectively (Fig. 2).

In order to evaluate if the drugs could promote a direct effect on the enzyme, we tested the *in vitro* effect of antipsychotics on acetylcholinesterase activity in zebrafish brain. All drugs were able to promote a significant decrease on zebrafish brain acetylcholinesterase activity. Haloperidol and olanzapine have significantly decreased the enzyme activity at 250 μ M (39.4% and 25.1%, respectively) (Fig. 3). Sulpiride has promoted a significant inhibition of acetylcholinesterase activity ranging from 10 to 250 μ M (24.5–61.8%) (Fig. 3).

4. Discussion

In the present study, we have observed significant changes on acetylcholinesterase activity and *ache* expression pattern in zebrafish brain after *in vitro* and *in vivo* exposure to antipsychotic drugs.

Considerable evidence suggests that complex interactions between dopaminergic and cholinergic systems are critical for the proper regulation of motor control (Di Chiara et al., 1994). Consistent with this notion, the severe motor deficits observed in patients suffering from Parkinson's disease and other extrapyramidal disorders are thought to reflect an imbalance between cholinergic and dopaminergic tone in the striatum (Brown and Taylor, 1996). In addition, cholinergic activity in the brain is essential to cognitive processes and motor control (Harder et al., 1998; Baxter et al., 1999). Studies have shown that deficits of working memory and attention are characteristic impairments in patients with schizophrenia (Elvevag and Goldberg, 2000). Typical antipsychotics with dopamine D2 antagonistic properties, such as haloperidol, have been shown to impair working memory in schizophrenic patients. Conversely, atypical antipsychotics with fewer dopamine D2 antagonistic properties, such as olanzapine, have improved working memory in schizophrenia (Bilder et al., 2002). Moreover, olanzapine, but not haloperidol, has improved consolidation processes in rats in a delayed radial maze task (Wolff and Leander, 2003). Interestingly, olanzapine has markedly increased acetylcholine

release in rat hippocampus whereas haloperidol has produced only a slight increase (Johnson et al., 2005). These findings suggest that an increase in acetylcholine release could be involved in the ameliorative effect of olanzapine. Considering that in our study only haloperidol treatment increased acetylcholinesterase activity, it is possible to suggest that a decrease in acetylcholine levels could be involved in cognitive deficit observed after haloperidol treatment.

The alterations promoted by haloperidol in acetylcholinesterase activity could be a consequence of transcriptional control. In order to verify whether the acetylcholinesterase gene could be modulated when zebrafish were exposed to haloperidol after 2 h, we have performed semi-quantitative RT-PCR experiments after 5 and 9 μ M haloperidol treatments. Interestingly, the results have demonstrated that acetylcholinesterase mRNA levels have been significantly increased after haloperidol exposure, suggesting that the increase of acetylcholinesterase activity observed in this treatment may be directly related to a higher *ache* expression.

Our results have also shown that all drugs tested were able to promote a significant decrease on acetylcholinesterase activity from zebrafish brain, when directly added in the enzyme assays, as performed for *in vitro* experiments. Differential effects promoted by haloperidol on AChE activity was observed for *in vivo* and *in vitro* experiments. These results could be related to the fact that the *in vitro* experiments evaluate the direct effect of the drug on the enzyme, without the influence of other biological systems, such as cell signaling pathways. Furthermore, therapeutic agents such as antipsychotic drugs that may interact with lipids arrangement are likely to modify membrane biological properties (Tessier et al., 2008). Since acetylcholinesterase is anchored to the outer surface of the plasma membrane by a covalently attached glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) structure, it is possible to suggest that changes in membrane bilayer environment promoted by the interaction with antipsychotics may be able to promote the inhibitory effect observed on acetylcholinesterase activity for *in vitro* experiments. For *in vivo* studies, we cannot exclude a possible direct effect of the drug in the membrane; however, the action of signaling pathways may modulate the cholinergic system promoting an increase of AChE activity.

Studies have described that chronic exposure to haloperidol impaired spatial learning performance in rats, which was associated with a reduction in central cholinergic markers (Terry et al., 2002, 2003). In contrast to typical agents like haloperidol, atypical antipsychotics are associated with reduced (or a lack of) extrapyramidal symptoms in schizophrenic patients (Buckley, 2001). Furthermore, atypical

antipsychotics are more effective in reducing negative symptoms and improving cognitive performance (Cuesta et al., 2001). These findings are significant, particularly since a wide range of cognitive deficits (i.e. attention, learning, memory, and executive functions) is generally found in these patients even in the earlier stages of their illness (Tollefson, 1996). Since extrapyramidal symptoms are commonly induced by typical antipsychotics, such as haloperidol, and atypical drugs are characterized by their lesser occurrence, the different response induced by these drugs on acetylcholinesterase could differentially modulate the acetylcholine levels, which could be involved in the higher or lower susceptibility to these undesired effects.

Because of the different neural architecture, the relevant brain regions for neurobehavioral functions in zebrafish certainly differ from those in mammals. Lesion studies show that the teleost cerebellum is essential in classical conditioning of discrete motor responses. The lateral telencephalic pallium of the teleost fish, proposed as homologous to the hippocampus, is selectively involved in spatial learning and memory, and in trace classical conditioning. In contrast, the medial pallium, considered homologous to the amygdala, is involved in emotional conditioning in teleost fish. The optic tectum, positioned much like the neocortex in mammals and constituting a considerable portion of the zebrafish brain (Wulliman and Rink, 2002) is the major processing area for visual processing in zebrafish (Kaethner and Stuermer, 1997). Therefore, there is a remarkable parallelism between mammals and teleost fish concerning the role of different brain centers in learning and memory and cognitive processes.

Several studies have investigated the involvement of dopaminergic systems to behavioral outcomes in adult zebrafish as well as developing zebrafish larvae (Anichtchik et al., 2004; Bretaudo et al., 2004; McKinley et al., 2005). Furthermore, previous studies have found that nicotine causes significant improvement in memory function as measured by a delayed task of spatial alternation (Levin and Chen, 2004) in zebrafish. This is quite similar to the effects of nicotine and other cognitive enhancing drugs in rodents, monkeys, and humans (Levin and Rezvani, 2002; Levin and Simon, 1998). There are previous studies in the literature evaluating several behavioral parameters in zebrafish after exposure to antipsychotic drugs. Giacomini et al. (2006) have showing that haloperidol and fluphenazine, both typical antipsychotics characterized to promote EPS in humans, develop erratic movements in zebrafish larvae, in contrast to olanzapine, which present minimal effects. These findings are in agreement with our results, which haloperidol promoted changes in AChE activity after *in vivo* exposure.

In summary, the findings of this study indicated that haloperidol treatment leads to changes in acetylcholinesterase activity and *ache* expression. On the other hand, atypical antipsychotics, such as olanzapine and sulpiride did not alter the acetylcholine degradation. Therefore, these findings have suggested that the alterations on zebrafish acetylcholinesterase could reveal molecular mechanisms related to cholinergic signaling induced by haloperidol treatment, which could be involved in adverse motor effects and cognitive dysfunction induced by this drug.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and by the FINEP research grant "Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)" 01.06.0842-00. E.P.R. was recipient of fellowship from CNPq. R.L.O. was recipient of fellowship from PIBIC/CNPq/PUCRS.

References

Amsterdam, A., Hopkins, N., 2006. Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease. *Trends Genet.* 22, 473–478.

- Anichtchik, O.V., Kaslin, J., Peitsaro, N., Scheinin, M., Panula, P., 2004. Neurochemical and behavioural changes in zebrafish *Danio rerio* after systemic administration of 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Neurochem.* 88, 443–453.
- Basunana, H., Villarreal, I., Alfonso, S., Bernabeu, M., Terre, R., 2000. Agitation in head injury. I, 2000. Definition and treatment with anxiolytic neuroleptics and antiepileptic drugs. *Rev. Neurol.* 30, 850–854.
- Baxter, M.G., Frick, K.M., Price, D.L., Breckler, S.J., Markowska, A.L., Gorman, L.K., 1999. Presynaptic markers of cholinergic function in the rat brain: relationship with age and cognitive status. *Neuroscience* 89, 771–779.
- Bertorelli, R., Consolo, S., 1990. D1 and D2 dopaminergic regulation of acetylcholine release from striatal of freely moving rats. *J. Neurochem.* 54, 2145–2148.
- Bilder, R.M., Goldman, R.S., Volavka, J., Czobor, P., Hoptman, M., Sheitman, B., Lindenmayer, J.P., Citrome, L., McEvoy, J., Kunz, M., Chakos, M., Cooper, T.B., Horowitz, T.L., Lieberman, J.A., 2002. Neurocognitive effects of clozapine, olanzapine, risperidone, and haloperidol in patients with chronic schizophrenia or schizoaffective disorder. *Am. J. Psychiatry* 159 (6), 1018–1028.
- Boehmler, W., Carr, T., Thisse, C., Thisse, B., Canfield, V.A., Levenson, R., 2007. D4 Dopamine receptor genes of zebrafish and effects of the antipsychotic clozapine on larval swimming behaviour. *Genes Brain Behav.* 6, 155–166.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bretaudo, S., Lee, S., Guo, S., 2004. Sensitivity of zebrafish to environmental toxins implicated in Parkinson's disease. *Neurotoxicol. Teratol.* 26, 857–864.
- Bretaudo, S., Li, Q., Lockwood, B.L., Kobayashi, K., Lin, E., Guo, S., 2007. A choice behavior for morphine reveals experience-dependent drug preference and underlying neural substrates in developing larval zebrafish. *Neuroscience* 146, 1109–1116.
- Brown, J.H., Taylor, P., 1996. Muscarinic receptor agonists and antagonists. In: Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W., Gilman, A.G. (Eds.), *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th ed. McGraw-Hill, New York, pp. 141–160.
- Buckley, P.F., 2001. Broad therapeutic use of atypical antipsychotic medications. *Biol. Psychiatry* 50, 912–924.
- Chen, W.Y., John, J.A.C., Lin, C.H., Lin, H.F., Wu, S.C., Lin, C.H., Chang, C.Y., 2004. Expression of metallothionein gene during embryonic and early larval development in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 69, 215–227.
- Clemente, D., Porteros, A., Weruaga, E., Alonso, J.R., Arenzana, F.J., Aijón, J., Arévalo, R., 2004. Cholinergic elements in the zebrafish central nervous system: histochemical and immunohistochemical analysis. *J. Comp. Neurol.* 474, 75–107.
- Cuesta, M.J., Peralta, V., Zarzuela, A., 2001. Effects of olanzapine and other antipsychotics on cognitive function in chronic schizophrenia: a longitudinal study. *Schizophr. Res.* 48, 17–28.
- Daniel, D.G., 2000. Antipsychotic treatment of psychosis and agitation in the elderly. *J. Clin. Psychiatry* 61, 49–52.
- Darland, T., Dowling, J.E., 2001. Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (20), 11691–11696.
- Di Chiara, G., Morelli, M., Consolo, S., 1994. Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: ACh/dopamine/NMDA interactions. *Trends Neurosci.* 17 (6), 228–233.
- Dooley, K., Zon, L.L., 2000. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 252–256.
- Eddins, D., Petro, A., Williams, P., Cerutti, D.T., Levin, E.D., in press. Nicotine effects on learning in zebrafish: the role of dopaminergic systems. *Psychopharmacology (Berl)*.
- Elisabetsky, E., Costa-Campos, L., 2006. The alkaloid alstonine: a review of its pharmacological properties. *Evid.-Based Complement. Alternat. Med.* 3, 39–48.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Feather-Stone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Elvevag, B., Goldberg, T.E., 2000. Cognitive impairment in schizophrenia is the core of the disorder. *Crit. Rev. Neurobiol.* 14, 1–21.
- Giacomini, N.J., Rose, B., Kobayashi, K., Guo, S., 2006. Antipsychotics produce locomotor impairment in larval zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.* 28, 245–250.
- Gomez, J., Zhang, L., Kostein, E., Felder, C., Bysmarter, F., Brodtkin, J., Harlan, S., Xia, B., Deng, C., Wess, J., 1999. Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M4 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Neurobiology* 96, 10483–10488.
- Guo, S., 2004. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes Brain Behav.* 3, 63–74.
- Harder, J.A., Baker, J.F., Ridley, R.M., 1998. The role of the central cholinergic projections in cognition: implications of the effects of scopolamine on discrimination learn by monkeys. *Brain Res. Bull.* 45, 319–326.
- Heusler, P., Tancredi, A.N., Lock, T., Cussac, D., 2008. Antipsychotics differ in their ability to internalise human dopamine D2S and human serotonin 5-HT1A receptors in HEK293 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 581, 37–46.
- Holzschuh, J., Ryu, S., Aberger, F., Driever, W., 2001. Dopamine transporter expression distinguishes dopaminergic neurons from other catecholaminergic neurons in the developing zebrafish embryo. *Mech. Dev.* 101, 237–243.
- Ichikawa, J., Kuroki, T., Dai, J., Meltzer, H.Y., 1998. Effect of antipsychotic drugs on extracellular serotonin levels in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Eur. J. Pharmacol.* 351, 163–171.
- Jaworski, J.N., Gonzales, R.A., Randall, P.K., 2001. Effect of dopamine D2/D3 receptor antagonist sulpiride on amphetamine-induced changes in striatal extracellular dopamine. *Eur. J. Pharmacol.* 418 (3), 201–206.

Please cite this article as: Seibt, K.J., et al., Typical and atypical antipsychotics alter acetylcholinesterase activity and *AChE* expression in zebrafish (*Danio rerio*) brain, *Comp. Biochem. Physiol. C* (2009), doi:10.1016/j.cbpc.2009.01.008

- Johnson, D.E., Yamazaki, H., Ward, K.M., Schmidt, A.W., Lebel, W.S., Treadway, J.L., Gibbs, E.M., Zawalich, W.S., Rollema, H., 2005. Inhibitory effects of antipsychotics on carbachol-enhanced insulin secretion from perfused rat islets: role of muscarinic antagonism in antipsychotic-induced diabetes and hyperglycemia. *Diabetes* 54, 1552–1558.
- Kaethner, R.J., Stuermer, C.A., 1997. Dynamics of process formation during differentiation of tectal neurons in embryonic zebrafish. *J. Neurobiol.* 32 (6), 627–639.
- Kiang, M., Daskalakis, Z.J., Christensen, B.K., Remington, G., Kapur, S., 2003. Actigraphic measurement of the effects of single-dose haloperidol and olanzapine on spontaneous motor activity in normal subjects. *J. Psychiatry Neurosci.* 28, 293–299.
- Kinon, B.J., Lieberman, J.A., 1996. Mechanisms of action of atypical antipsychotic drugs: a critical analysis. *Psychopharmacology* 124, 2–34.
- Krens, S.F., Spaik, H.P., Snaar-Jagalska, B.E., 2006. Functions of the MAPK family in vertebrate-development. *FEBS Lett.* 580, 4984–4990.
- Levin, E.D., Chen, E., 2004. Nicotinic involvement in memory function in zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.* 26, 731–735.
- Levin, E.D., Rezvani, A., 2002. Nicotinic treatment for cognitive dysfunction. *Current Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 1, 423–431.
- Levin, E.D., Simon, B.B., 1998. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology* 138, 217–230.
- Mahadik, S.P., Laev, H., Korenovsky, A., Karpiak, S.E., 1988. Haloperidol alters rat CNS cholinergic system: enzymatic and morphological analyses. *Biol. Psychiatry* 24, 199–217.
- McClelland, G.R., Cooper, S.M., Pilgrim, A.J., 1990. A comparison of the central nervous system effects of haloperidol, chlorpromazine and sulpiride in normal volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 30 (6), 795–803.
- McKinley, E.T., Baranowski, T.C., Blavo, D.O., Cato, C., Doan, T.N., Rubinstein, A.L., 2005. Neuroprotection of MPTP-induced toxicity in zebrafish dopaminergic neurons. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 141, 128–137.
- Ninkovic, J., Bally-Cuif, L., 2006. The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. *Methods* 39, 262–274.
- Pariikh, V., Terry, A.V., Khan, M.M., Mahadik, S.P., 2004. Modulation of nerve growth factor and choline acetyltransferase expression in rat hippocampus after chronic exposure to haloperidol, risperidone, and olanzapine. *Psychopharmacology* 172, 365–374.
- Perry, E., Walker, M., Grace, J., Perry, R., 1999. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends Neurosci.* 22, 273–280.
- Richelson, E., Souder, T., 2000. Binding of antipsychotic drugs to human brain receptors focus on newer generation compounds. *Life Sci.* 68, 29–39.
- Rico, E.P., Rosemberg, D.B., Senger, M.R., Arizi, M.B., Bernardi, G.F., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2006. Methanol alters ecto-nucleotidases and acetylcholinesterase in zebrafish brain. *Neurotoxicol. Teratol.* 28, 489–496.
- Seeman, P., 2002. Atypical antipsychotics: mechanism of action. *Can. J. Psychiatry* 47 (1), 27–38.
- Soreq, H., Seidman, S., 2001. Acetylcholinesterase—new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 294–302.
- Terry Jr., A.V., Hill, W.D., Pariikh, V., Evans, D.R., Waller, J.L., Mahadik, S.P., 2002. Differential effects of chronic haloperidol and olanzapine exposure on brain cholinergic markers and spatial learning in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 164, 360–368.
- Terry Jr., A.V., Hill, W.D., Pariikh, V., Waller, J.L., Evans, D.R., Mahadik, S.P., 2003. Differential effects of haloperidol, risperidone, and clozapine exposure on cholinergic markers and spatial learning performance in rats. *Neuropsychopharmacology* 28, 300–309.
- Tessier, C., Nuss, P., Staneva, G., Wolf, C., 2008. Modification of membrane heterogeneity by antipsychotic drugs: an X-ray diffraction comparative study. *J. Colloid Interface Sci.* 320, 469–475.
- Tollefson, G.D., 1996. Cognitive functions in schizophrenic patients. *J. Clin. Psychiatry* 57, 31–39.
- Tsukada, H., Harada, N., Nishiyama, S., Ohba, H., Kakiuchi, T., 2000. Cholinergic neuronal modulation alters dopamine D2 receptor availability *in vivo* by regulation receptor affinity induced by facilitated synaptic dopamine turnover: positron emission tomography studies with microdialysis in the conscious monkey brain. *J. Neurosci.* 20, 7067–7073.
- Wadenberg, M.L., Soliman, A., VandenSpek, S.C., Kapur, S., 2001. Dopamine D2 receptor occupancy is a common mechanism underlying animal models of antipsychotics and their clinical effects. *Neuropsychopharmacology* 25, 633–641.
- Winkler, J., Suhr, S.T., Gage, F.H., Thal, L.J., Fisher, L.J., 1995. Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory. *Nature* 375, 484–487.
- Wolff, M.C., Leander, J.D., 2003. Comparison of the effects of antipsychotics on a delayed radial maze task in the rat. *Psychopharmacology (Berl.)* 168, 410–416.
- Wulliman, M.F., Rink, E., 2002. The teleostean forebrain: a comparative and developmental view based on early proliferation, Pax6 activity and catecholaminergic organization. *Brain Res. Bull.* 57, 363–370.
- Zhou, F.M., Liang, Y., Dani, J.A., 2001. Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum. *Nat. Neurosci.* 4, 1224–1229.
- Zirger, J.M., Beattie, C.E., McKay, D.B., Boyd, R.T., 2003. Cloning and expression of zebrafish neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Gene Expr. Patterns* 3, 747–754.

3. CAPÍTULO 3

Antipsychotic drugs inhibit nucleotide hydrolysis in zebrafish (*Danio rerio*) brain membranes

Kelly Juliana Seibt, Renata da Luz Oliveira, Eduardo Pacheco Rico, Renato Dutra Dias,

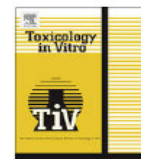
Mauricio Reis Bogo, Carla Denise Bonan

Artigo publicado na revista Toxicology in vitro



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology in Vitro

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

Antipsychotic drugs inhibit nucleotide hydrolysis in zebrafish (*Danio rerio*) brain membranes

Kelly Juliana Seibt^a, Renata da Luz Oliveira^a, Eduardo Pacheco Rico^b, Renato Dutra Dias^a, Mauricio Reis Bogo^{c,*}, Carla Denise Bonan^{a,*}

^a Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2600-Anexo, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^c Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 August 2008
Accepted 16 October 2008
Available online xxx

Keywords:

Haloperidol
Sulpiride
Olanzapine
Antipsychotic
Schizophrenia
Ectonucleotidase
Zebrafish

ABSTRACT

Haloperidol (HAL), olanzapine (OLZ), and sulpiride (SULP) are antipsychotic drugs widely used in the pharmacotherapy of psychopathological symptoms observed in schizophrenia or mood-related psychotic symptoms in affective disorders. Here, we tested the *in vitro* effects of different concentrations of a typical (HAL) and two atypical (OLZ and SULP) antipsychotic drugs on ectonucleotidase activities from zebrafish brain membranes. HAL inhibited ATP (28.9%) and ADP (26.5%) hydrolysis only at 250 μ M. OLZ decreased ATPase activity at all concentrations tested (23.8–60.7%). SULP did not promote significant changes on ATP hydrolysis but inhibited ADP hydrolysis at 250 μ M (25.6%). All drugs tested, HAL, OLZ, and SULP, did not promote any significant changes on 5'-nucleotidase activity in the brain membranes of zebrafish. These findings demonstrated that antipsychotic drugs could inhibit NTPDase activities whereas did not change 5'-nucleotidase. Such modulation can alter the adenosine levels, since the ectonucleotidase pathway is an important source of extracellular adenosine. Thus, it is possible to suggest that changes promoted by antipsychotic drugs in the bilayer membrane could alter the NTPDase activities, modulating extracellular ATP and adenosine levels.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Schizophrenia has traditionally been treated with the so-called typical antipsychotic drugs, such as chlorpromazine or HAL, which have potent D2 dopamine receptor antagonist properties. These drugs are effective in reducing the positive symptoms of schizophrenia, such as hallucinations and delusions. However, they are less effective at reducing the incidence of negative symptoms such as apathy and poor social functioning, nor do they have significant effects on cognitive deficits of the illness. These drugs are also associated with a high incidence of extrapyramidal symptoms (EPS). Clozapine (CLO), the first drug to be introduced into clinical practice as an atypical antipsychotic drug, maintains efficacy in treating the positive and negative symptoms. CLO also has a low incidence of EPS and it is considered as the first-choice drug for treatment-resistant schizophrenic patients (Kane et al., 1988; Fleischhacker, 1999).

This drug has been classified based on less selective activity across several neurotransmitter receptors (moderately potent antagonists at 5HT₂ receptors with lesser and equal potency at D1, D2, and α_1 -adrenergic receptors) (Kapur et al., 1999; Wadenberg et al., 2001; Seeman, 2002).

The neuromodulator adenosine has been proposed to contribute to the pathophysiology of schizophrenia. This hypothesis postulates that a dysfunction in adenosinergic activity in schizophrenia would lead to putative alterations of dopaminergic and glutamatergic activities. Moreover, the ubiquity of adenosine could also account for some of the systemic alterations reported in schizophrenic patients (Lara and Souza, 2000; Lara et al., 2006). The proposed adenosine dysfunction in schizophrenia, leading to a synaptic adenosinergic deficit, could be due to receptor alterations or altered metabolism, decreased production/release or increased degradation/uptake of adenosine (Lara et al., 2006). ATP and adenosine are important signaling molecules in the central nervous system (Ralevic and Burnstock, 1998). ATP is synthesized, stored and released by the central and peripheral nervous systems upon depolarization (Phillis and Wu, 1981; Bodin and Burnstock, 2001). It has been proposed that extracellular ATP

* Corresponding authors. Tel.: +55 51 3320 3500x4158; fax: +55 51 3320 3568.
E-mail addresses: mbogo@puccrs.br (M.R. Bogo), cbonan@puccrs.br (C.D. Bonan).

evokes responses by two families of P2 receptors, namely, P2X ionotropic ligand-gated ion channel receptors and P2Y metabotropic G protein-coupled receptors (for a review see Burnstock, 2006). The signaling actions induced by extracellular ATP are directly correlated to the activity of ectonucleotidases once they trigger the enzymatic conversion of ATP to adenosine (Zimmermann, 2001; Robson et al., 2006). Ectonucleotidases constitute a highly refined system for the regulation of nucleotide-mediated signaling, controlling the rate, amount and timing of nucleotide degradation and formation. The hydrolysis of ATP to AMP is catalyzed mainly by a family of ectonucleotidases, named nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDases). The nucleotide AMP is hydrolyzed to adenosine, an important neuromodulator, by the action of an ecto-5'-nucleotidase (Zimmermann, 1992, 1996, 2001). The neuromodulator adenosine can mediate different cellular functions by operating G-protein-coupled receptors, named A₁, A_{2A}, A_{2B}, and A₃, which can inhibit (A₁ and A₃) or facilitate (A_{2A} and A_{2B}) neuronal communication (Fredholm et al., 2001).

Our laboratory has characterized the presence of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in the zebrafish brain membranes (Rico et al., 2003; Senger et al., 2004). Zebrafish is a small freshwater teleost fish widely used as a model to study vertebrate developmental, neurobiological, and toxicological mechanisms (Fetcho and Liu, 1998; Hill et al., 2005). This species may be an ideal vertebrate model system for numerous human diseases, where genetic and biological mechanisms of the diseases may be studied (Dodd et al., 2000; Gerlai et al., 2000; Ivetac et al., 2000). Zebrafish genes present a high degree of conservation and share a 70–80% homology with human genes (Dooley and Zon, 2000).

Studies have shown that antipsychotics, such as chlorpromazine, are able to inhibit Na⁺, K⁺-ATPase, and Ca²⁺-ATPase activity in rat brain (Mazumder et al., 1990). Furthermore, fluphenazine and HAL (both of which can induce severe EPS in humans) develop movement defects in larval zebrafish. In contrast, OLZ, which produces mild to little EPS in humans, leads to minimal movement defects in larval zebrafish (Giacomini et al., 2006). Clozapine also produced a rapid and profound effect on locomotor activity (hypoactivity) in larval zebrafish (Boehmler et al., 2007). In addition, it has been shown that serum adenosine deaminase activity, which converts adenosine into inosine, is increased in schizophrenic patients treated either with typical antipsychotics or clozapine (Brunstein et al., 2007).

Considering that zebrafish may be an ideal vertebrate model system for numerous human diseases and that purinergic system is present in the zebrafish brain, the aim of this study is to evaluate the *in vitro* effects of different concentrations of a typical antipsychotic (HAL) and two atypical (OLZ and SULP) antipsychotic drugs on ectonucleotidase activities from the zebrafish brain membranes.

2. Material and methods

2.1. Animals

Adult zebrafish of both sexes were obtained from a commercial supplier (Delphis, RS, Brazil) and acclimated for at least two weeks in a 50-l thermostated aquarium filled with unchlorinated and constantly aerated water. Fish were kept on a 12 h light/dark cycle (with lights turning on at 7:00 am), and at a temperature of 25 ± 2 °C. They were used according to the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" published by the US National Institutes of Health (NIH publication N° 85–23, revised 1996), being healthy and free of any signs of disease. The Ethics Committee of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS) approved the protocol under the number 014/08–CEUA.

2.2. Chemicals

SULP, HAL, OLZ, Trizma Base, EDTA, EGTA, sodium citrate, Coomassie blue G, bovine serum albumin, malachite green, ammonium molybdate, polyvinyl alcohol, nucleotides, calcium, and magnesium chloride were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other reagents used were from analytical grade.

2.3. *In vitro* treatments

Antipsychotics, HAL, SULP, and OLZ, were added to reaction medium before the preincubation with the enzyme, and were maintained throughout the enzyme assays. Antipsychotics were tested at final concentrations of 1, 10, 50, 100, and 250 μM.

2.4. Membrane preparation

The preparation of brain membranes was performed as described previously by Barnes et al. (1993). Zebrafish were euthanized by decapitation, their brains were removed from the cranial skull by the dissection technique. For each sample (membrane preparation), a pool of five zebrafish brains was used, which were briefly homogenized in 60 volumes (v/w) of chilled Tris-citrate buffer (50 mM Tris, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, pH 7.4, with citric acid) in a motor driven Teflon-glass homogenizer. The samples were centrifuged at 1000 g for 10 min and the pellet was discarded. The supernatant was centrifuged for 25 min at 4000g. The resultant pellet was frozen in liquid nitrogen, thawed, resuspended in Tris-citrate buffer, and centrifuged for 20 min at 4000g. This fresh-thaw-wash procedure was used to ensure the lysis of the brain membranes. The final pellet was resuspended and used in the enzyme assays. All samples were maintained at 2–4 °C throughout preparation.

2.5. Enzyme assays

NTPDase and 5'-nucleotidase assays were performed as described previously (Rico et al., 2003; Senger et al., 2004). Zebrafish brain membranes (3 μg protein for NTPDase and 5 μg protein for 5'-nucleotidase) were added to the reaction mixture containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 5 mM CaCl₂ (for the NTPDase activity) or 50 mM Tris-HCl (pH 7.2) and 5 mM MgCl₂ (for the 5'-nucleotidase activity) at a final volume of 200 μl. The samples were preincubated for 10 min at 37 °C and the reaction was initiated by the addition of substrate (ATP, ADP or AMP) to a final concentration of 1 mM. The reaction was stopped after 30 min by the addition of 200 μl trichloroacetic acid at a final concentration of 5%. The samples were chilled on ice for 10 min and 1 ml of a colorimetric reagent composed of 2.3% polyvinyl alcohol, 5.7% ammonium molybdate, and 0.08% malachite green was added in order to determine the inorganic phosphate released (Pi) (Chan et al., 1986). After 20 min, the quantification of inorganic phosphate (Pi) released was determined spectrophotometrically at 630 nm. Incubation times and protein concentrations were chosen to ensure the linearity of the reactions. Controls with the addition of the enzyme preparation after mixing with trichloroacetic acid were used to correct non-enzymatic hydrolysis of substrates. Specific activity was expressed as nanomoles of Pi released per minute per milligram of protein. All enzyme assays were run at least in triplicate.

2.6. Protein determination

Protein was measured using Coomassie blue as the color reagent (Bradford, 1976) and bovine serum albumin was used as standard.

2.7. Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), being expressed as means \pm S.D. of three different experiments ($n = 3$). A Tukey multiple test range as post-hoc was performed at $\alpha = 0.05$.

3. Results

We tested the *in vitro* effect of HAL, OLZ, and SULP (at concentrations varying from 1 to 250 μ M) on NTPDase and 5'-nucleotidase activities from zebrafish brain membranes. HAL promoted a significant inhibition on ATP and ADP hydrolysis (28.9% and 26.5%, respectively) only at 250 μ M, when compared to the control group (Fig. 1). In contrast, OLZ significantly inhibited ATP hydrolysis at all concentrations tested (23.8–60.7%) in a dose-dependent manner (Fig. 2). There were no significant changes in ADP hydrolysis in the presence of OLZ at all concentrations tested.

SULP did not alter ATP hydrolysis whereas ADP hydrolysis was inhibited at 250 μ M (25.6%) (Fig. 3). All drugs tested, HAL, OLZ, and SULP, did not promote any significant changes on 5'-nucleotidase activity in zebrafish brain membrane, when compared to the control group (Figs. 1–3, respectively).

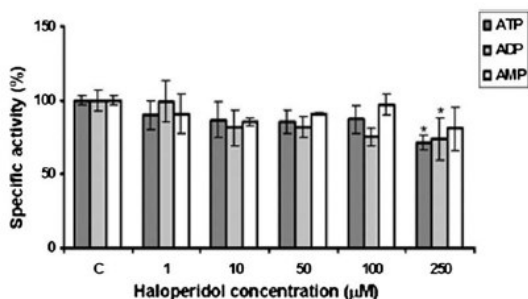


Fig. 1. *In vitro* effect of varying concentrations of haloperidol (1–250 μ M) on ATP, ADP, and AMP hydrolysis in zebrafish brain membranes. Bars represent the mean \pm S.D. of at least three different experiments, each one performed in triplicate. The symbol (*) indicates difference when compared to the control group. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey test as post-hoc test, considering $P \leq 0.05$ as significant.

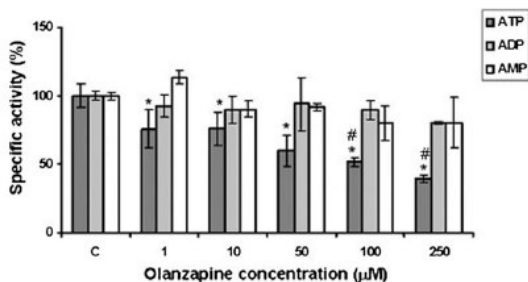


Fig. 2. *In vitro* effect of varying concentrations of olanzapine (1–250 μ M) on ATP, ADP, and AMP hydrolysis in zebrafish brain membranes. Bars represent the mean \pm S.D. of at least three different experiments, each one performed in triplicate. The symbol (*) indicates difference when compared to the control group. The symbol (#) indicates difference when compared to the 1 and 10 μ M OLZ. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey test as post-hoc test, considering $P \leq 0.05$ as significant.

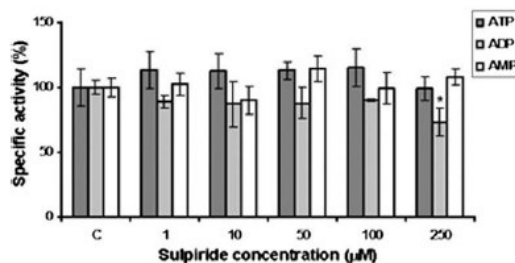


Fig. 3. *In vitro* effect of sulpiride on NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activity in zebrafish brain membranes. ATP, ADP, and AMP hydrolysis were evaluated in different concentrations (1–250 μ M). Bars represent the mean \pm S.D. of at least three different experiments, each one performed in triplicate. The symbol (*) indicates difference when compared to the control group. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey test as post-hoc test, considering $P \leq 0.05$ as significant.

4. Discussion

The findings of the present study have demonstrated that NTPDase, but not 5'-nucleotidase, was altered by the action of antipsychotic drugs in the zebrafish brain membranes. Our results have shown that OLZ promoted the most intense effects on NTPDase activity, inhibiting ATP hydrolysis at all concentrations tested. However, HAL and SULP promoted a decrease on ATP hydrolysis only in the highest concentration tested. The ectonucleotidases may play a relevant role in several pathophysiological situations, such as schizophrenia, since these enzymes contribute to maintenance of extracellular ATP, ADP, AMP, and adenosine levels (Agtesch et al., 1999; Lara and Souza, 2000; Lara et al., 2006; Burnstock, 2008).

The discovery of antagonistic interactions between adenosine A_{2A} receptors and dopamine D2 receptors in the central nervous system suggests that the adenosine may be involved in the pathogenesis of psychiatric and neurological disorders (Martini et al., 2006). Different studies have demonstrated the effect of antipsychotic drugs on ATPase activities. Chlorpromazine *in vitro* inhibited Na^+ , K^+ -ATPase activity in rat brain microsomal membranes in a time- and dose-dependent manner (Mazumder et al., 1990). Furthermore, *in vivo* treatment with this drug has shown that Na^+ , K^+ -ATPase, and Ca^{2+} -ATPase activities were reduced with increasing concentrations or time exposures in microsomal membranes of different organs (Mazumder et al., 1990). Our results are consistent with these studies, demonstrating that the ATP hydrolysis in the zebrafish brain membranes is inhibited by antipsychotic drugs.

Antipsychotic drugs have shown high affinity for biomembranes due to their amphipathic and amphiphilic properties. This implies that antipsychotic drugs can interact with membrane lipid organization. Antipsychotic intercalation in the membrane can modify the membrane lipid dynamic, possibly inducing a subsequent modification of the receptor response (Tessier et al., 2008). Drug interaction with the biomembrane influences the bilayer structure, consequently, modulating processes that range from membrane-bound enzyme activity and receptor binding to membrane permeability and transport (Carfagna and Muhoberac, 1993). The intercalation of antipsychotic drug molecules into the plasma membrane may thus modulate the efficacy and tolerability profile of compounds able to exert their therapeutic effect through their binding with synapse receptors, in particular dopamine D2 receptors. This suggests that pharmacological activity of antipsychotic medications may result from a combination of drug–receptor and drug–membrane interactions

(Jutila et al., 2001). These results suggest additional mechanisms by which antipsychotics may exert some of their pharmacological activities. NTPDase1, 2, 3, and 8 are firmly anchored to the membrane via two transmembrane domains that, in the instance of NTPDase1, are important for maintaining catalytic activity and substrate specificity (Grinthal and Guidotti, 2006). Papanikolaou et al. (2005) have shown that removing cholesterol from membranes of NTPDase1-expressing cells reduces ATPase activity to the same extent as solubilization does. However, these authors have suggested that some aspects of cholesterol other than its effect on membrane fluidity are required for native transmembrane helix properties of the enzyme. If the balance between stability and mobility is a key feature of the interplay between the transmembrane domains and the active site of NTPDase1, anything that changes the bilayer stability might change NTPDase activity by altering this balance (Grinthal and Guidotti, 2006). Thus, changes in the membrane bilayer environment promoted by the interaction with haloperidol, olanzapine, and sulpiride may be able to promote the inhibitory effect observed on NTPDase activity. Thus, it is possible to suggest that changes induced by antipsychotics on membrane structure could affect NTPDase activities, and consequently, could modulate ATP and adenosine levels in the synaptic cleft. In contrast, ecto-5'-nucleotidase was not altered by antipsychotic drugs at the doses tested. Ecto-5'-nucleotidase is attached via a GPI (glycosylphosphatidylinositol) anchor to the extracellular membrane (Sträter, 2006). The different effects induced by antipsychotic drugs on NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities can be related to the differences in membrane anchorage of these enzymes. Previous studies from our laboratory have shown that antidepressant drugs can also promote similar effects on NTPDase activity (Pedrazza et al., 2007), which reinforce the idea that changes in the membrane bilayer induced by these drugs can modulate the extracellular nucleotide hydrolysis.

In summary, this study has shown that HAL, OIZ, and SULP can alter the ectonucleotidase activities, suggesting that the extracellular adenosine levels can be modulated by antipsychotic drugs.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and by the FIN-EP research grant "Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)" 01.06.0842-00. E.P.R. was recipient of fellowship from CNPq. R.L.O. was recipient of fellowship from PIBIC/CNPq/PUCRS.

References

- Agteresch, H.J., Dagnelie, P.C., Van den Berg, J.W., Wilson, J.H., 1999. Adenosine triphosphate: established and potential clinical applications. *Drugs* 58 (2), 211–232.
- Barnes, J.M., Murphy, P.A., Kirkham, D., Henley, J.M., 1993. Interaction of guanine nucleotides with [3H] kainate and 6-[3H] cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione binding in goldfish brain. *Journal of Neurochemistry* 61, 1685–1691.
- Bodin, P., Burnstock, G., 2001. Purinergic signalling: ATP release. *Neurochemical Research* 26 (8–9), 959–969.
- Boehmler, W., Carr, T., Thisse, C., Thisse, B., Canfield, V.A., Levenson, R., 2007. D4 Dopamine receptor genes of zebrafish and effects of the antipsychotic clozapine on larval swimming behaviour. *Genes, Brain and Behavior* 6 (2), 155–166.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Brunstein, M.G., Silveira Jr., E.M., Chaves, L.S., Machado, H., Schenkel, O., Belmonte-de-Abreu, P., Souza, D.O., Lara, D.R., 2007. Increased serum adenosine deaminase activity in schizophrenic receiving antipsychotic treatment. *Neuroscience Letters* 414 (1), 61–64.
- Burnstock, G., 2006. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacological Reviews* 58, 58–86.
- Burnstock, G., 2008. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nature Reviews Drug Discovery* 7 (7), 575–590.
- Carfagna, M.A., Muhoberac, B.B., 1993. Interaction of tricyclic drug analogs with synaptic plasma membranes: structure–mechanism relationships in inhibition of neuronal Na⁺/K⁺-ATPase activity. *Molecular Pharmacology* 44, 129–141.
- Chan, K., Delfert, D., Jungner, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-ATPase activity. *Analytical Biochemistry* 157, 375–380.
- Dodd, A., Curtis, P.M., Williams, L.C., Love, D.A., 2000. Zebrafish: bridging the gap between development and disease. *Human Molecular Genetics* 9 (16), 2443–2449.
- Dooley, K., Zon, L.I., 2000. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current Opinion in Genetics and Development* 10, 252–256.
- Kane, J., Honigfeld, G., Singer, J., Meltzer, H., 1988. Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic. A double-blind comparison with chlorpromazine. *Archives of General Psychiatry* 45 (9), 789–796.
- Fetcho, J.R., Liu, K.S., 1998. Zebrafish as a model system for studying neuronal circuits and behavior. *Annals of the New York Academy of Sciences* 860, 333–345.
- Fleischhacker, W.W., 1999. Clozapine: a comparison with other novel antipsychotics. *Journal of Clinical Psychiatry* 60 (Suppl. 12), 30–34.
- Fredholm, B., Ijzerman, A.P., Jacobson, K.A., Klotz, K.N., Linden, J., 2001. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological Reviews* 53 (4), 527–552.
- Gerlai, R., Lahav, S., Guo, S., Rosenthal, A., 2000. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 67, 773–782.
- Giacomini, N.J., Rose, B., Kobayashi, K., Guo, S., 2006. Antipsychotics produce locomotor impairment in larval zebrafish. *Neurotoxicology Teratology* 28 (2), 245–250.
- Grinthal, A., Guidotti, G., 2006. CD39, NTPDase 1, is attached to the plasma membrane by two transmembrane domains. Why? *Purinergic Signalling* 2, 391–398.
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E., 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences* 86, 6–19.
- Ivetac, I., Becanovic, J., Krishnapillai, V., 2000. Zebrafish: genetic tools and genomics. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 8, 1–11.
- Jutila, A., Soderlund, T., Pakkanen, A.L., Huttunen, M., Kinnunen, P.K., 2001. Comparison of the effects of clozapine, chlorpromazine, and haloperidol on membrane lateral heterogeneity. *Chemistry and Physics Lipids* 112, 151–163.
- Kapur, S., Zipursky, R.B., Remington, G., 1999. Clinical and theoretical implications of 5-HT and D2 receptor occupancy of clozapine, risperidone and olanzapine in schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* 156 (2), 286–293.
- Lara, D.R., Souza, D.O., 2000. Schizophrenia: a purinergic hypothesis. *Medical Hypotheses* 54, 157–166.
- Lara, D.R., Dall'Igna, O.P., Ghisolfi, E.S., Brunstein, M.G., 2006. Involvement of adenosine in the neurobiology of schizophrenia and its therapeutic implications. *Progress in Neuro-psychopharmacology* 30, 617–629.
- Martini, C., Tuscano, D., Trincavelli, M.L., Cerrai, E., Bianchi, M., Ciapparelli, A., Alessio, L., Novelli, L., Catena, M., Lucacchini, A., Cassano, G.B., Dell'Osso, L., 2006. Upregulation of A_{2A} adenosine receptors in platelets from patients affected by bipolar disorders under treatment with typical antipsychotics. *Journal of Psychiatric Research* 40 (1), 81–88.
- Mazumder, B., Mukherjee, S., Sen, P.C., 1990. The chlorpromazine inhibition of transport ATPase and acetylcholinesterase activities in the microsomal membranes of rat *in vitro* and *in vivo*. *Molecular and Cellular Biochemistry* 95 (1), 13–20.
- Papanikolaou, A., Papafofika, A., Murphy, C., Papamarcaki, T., Tsolas, O., Drab, M., Kurzchalia, T.V., Kasper, M., Christoforidis, S., 2005. Cholesterol-dependent lipid assemblies regulate the activity of the ectonucleotidase CD39. *Journal of Biological Chemistry* 280, 26406–26414.
- Pedrazza, E.L., Senger, M.R., Pedrazza, L., Zimmermann, F.F., Sarkis, J.J.F., Bonan, C.D., 2007. Sertraline and clomipramine inhibit nucleotide catabolism in rat brain synaptosomes. *Toxicology In Vitro* 21, 671–676.
- Phillips, J.W., Wu, P.H., 1981. The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Progress in Neurobiology* 16, 187–239.
- Ralevic, V., Burnstock, G., 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological Review* 50 (3), 413–492.
- Rico, E.P., Senger, M.R., Fauth, M.G., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2003. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Life Science* 73, 2071–2082.
- Robson, S.R., Sevigny, J., Zimmermann, Z., 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling* 2, 409–430.
- Seeman, P., 2002. Atypical antipsychotics: mechanism of action. *Canadian Journal of Psychiatry* 47 (1), 27–28.
- Senger, M.R., Rico, E.P., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2004. Ecto-5'-nucleotidase activity in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 139 (2), 203–207.
- Sträter, N., 2006. Ecto-5'-nucleotidase: structure function relationships. *Purinergic Signalling* 2, 343–350.

- Tessier, C., Nuss, P., Staneva, G., Wolf, G., 2008. Modification of membrane heterogeneity by antipsychotic drugs: an X-ray diffraction comparative study. *Journal of Colloid and Interface Science* 320, 469–475.
- Wadenberg, M.L., Soliman, A., VandenSpek, S.C., Kapur, S., 2001. Dopamine D2 receptor occupancy is a common mechanism underlying animal models of antipsychotics and their clinical effects. *Neuropsychopharmacology* 25 (5), 633–641.
- Zimmermann, H., 1992. 5'- nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *The Biochemical Journal* 285, 345–365.
- Zimmermann, H., 1996. Biochemistry, location and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Progress in Neurobiology* 49, 589–618.
- Zimmermann, H., 2001. Ecto-nucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Development Research* 52, 44–56.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A esquizofrenia é uma doença neuropsiquiátrica grave que afeta cerca de 1% da população mundial (MAJ & SARTORIUS, 2005). A descoberta dos antipsicóticos e de seus prováveis mecanismos de ação revolucionou o estudo da esquizofrenia. Os processos neuropatológicos e possíveis tratamentos ainda não estão totalmente esclarecidos. Apesar dos avanços importantes nas últimas décadas, existem muitos aspectos a serem compreendidos sobre a esquizofrenia e as intervenções farmacológicas, a fim de minimizar os sintomas dessa patologia. Em busca de um melhor entendimento sobre os mecanismos de ação dos fármacos antipsicóticos, neste estudo observamos as ações de três fármacos antipsicóticos sobre parâmetros da sinalização colinérgica e purinérgica, as quais não são classicamente relacionadas com a ação farmacológica promovida por estes fármacos.

No Capítulo 2, foi avaliado o efeito *in vitro* e *in vivo* dos fármacos antipsicóticos (haloperidol, olanzapina e sulpirida) sobre a atividade e expressão gênica da AChE em cérebro de zebrafish. Os resultados demonstraram que todas as drogas foram capazes de alterar a atividade da AChE no estudo *in vitro*, promovendo um decréscimo significativo na atividade da enzima quando comparada ao grupo controle. Há evidências que fármacos antipsicóticos podem interagir com o arranjo lipídico e, desta maneira, provocar alterações na organização estrutural da membrana (TESSIER et al., 2008). Sabendo que a AChE é uma enzima que se encontra ancorada na superfície da membrana plasmática, é possível sugerir que mudanças na bicamada lipídica promovida pela interação com antipsicóticos poderia explicar, pelo menos em parte, o efeito inibitório observado na atividade da AChE. Já no estudo *in vivo*, somente o haloperidol foi capaz de alterar a atividade da AChE, promovendo uma significativa ativação na atividade da enzima após 2 horas de exposição

dos animais à droga. Diversos estudos têm verificado que a interação entre o sistema dopaminérgico e colinérgico é um dos fatores críticos para a regulação do controle motor (DI CHIARA et al., 1994). Antipsicóticos típicos, como o haloperidol, apresentam propriedades antagonistas D2 provocando danos na memória de trabalho dos pacientes com esquizofrenia, sendo que antipsicóticos atípicos, tais como a olanzapina, demonstram uma melhora nesse quadro (BILDER et al., 2002). Estudos mostraram que a olanzapina, mas não o haloperidol, é capaz de melhorar os processos de consolidação de memória em ratos em uma tarefa de labirinto radial (WOLFF & LEANDER, 2003). Considerando que no nosso estudo somente o tratamento com haloperidol aumentou a atividade da AChE, é possível sugerir que uma diminuição nos níveis de ACh, referente a uma maior capacidade de clivagem deste neurotransmissor, poderia estar envolvida nos déficits cognitivos observados após o tratamento com haloperidol. Além das alterações cinéticas, o haloperidol promoveu um aumento significativo sobre os níveis de transcritos do gene *ache*, sugerindo que o aumento observado na atividade da AChE pode estar diretamente relacionado com um aumento na expressão dos níveis de transcritos.

A atividade da AChE pode ser usada como um marcador da função colinérgica e mudanças na atividade da enzima poderiam indicar alterações na disponibilidade de ACh e no nível de seus receptores (FERNANDES & HODGES-SAVOLA, 1992). O número de moléculas de AChE pode ser aumentado (MOUDGIL & KANUDO, 1973) ou diminuído (BATTIE & MORAN, 1990), dependendo do estímulo recebido. Os níveis de AChE parecem ser controlados pela interação de ACh com seus receptores e quando esta interação é acentuada, aumentam os níveis de AChE. Neste trabalho, os fármacos antipsicóticos promoveram uma significativa inibição na atividade da AChE nos estudos *in*

vitro e uma ativação nos estudos *in vivo* e nos níveis de mRNA desta enzima. Desta forma, alterações divergentes promovidas pelo haloperidol na atividade da AChE puderam ser observadas para os experimentos *in vivo* e *in vitro*. Estes resultados poderiam estar relacionados ao fato que no estudo *in vitro* observa-se o efeito da droga diretamente na atividade enzimática, sem influência dos outros sistemas biológicos, tais como mecanismos de sinalização celular. Na literatura, está relatado que drogas antipsicóticas, como o haloperidol, apresentam propriedades lipofílicas tendo capacidade de interagir com membranas biológicas. Esta alteração poderia estar relacionada com a inibição da atividade da AChE provocada pelo haloperidol *in vitro*. Para os estudos *in vivo*, além da possibilidade da ação deste antipsicótico na estrutura da bicamada lipídica, não podemos descartar uma possível influência indireta através da atuação em sistemas ou cascatas de sinalização capazes de modular o sistema colinérgico através de uma resposta no aumento da atividade da AChE.

No Capítulo 3, foi avaliado o efeito *in vitro* dos fármacos antipsicóticos na hidrólise de ATP, ADP e AMP em membranas cerebrais de zebrafish, com o objetivo de verificar se os fármacos antipsicóticos possuem algum efeito direto sobre as atividades ectonucleotidásicas. Um provável efeito direto promovido por estes fármacos poderia ter uma importante relevância e influenciar nos resultados dos experimentos *in vivo* futuros. Os resultados obtidos demonstraram que o haloperidol promoveu uma inibição significativa sobre a hidrólise de ATP e ADP, enquanto que a sulpirida inibiu somente a hidrólise de ADP e a olanzapina promoveu um decréscimo significativo apenas sobre a hidrólise de ATP. Nenhuma das drogas foi capaz de alterar significativamente a atividade da ecto-5'-nucleotidase em membranas cerebrais de zebrafish. Diferentes estudos têm

demonstrado os efeitos dos fármacos antipsicóticos na atividade ATPásica. Clorpromazina *in vitro* foi capaz de inibir a atividade da Na⁺-K⁺-ATPase em membranas cerebrais microssomais de ratos (MAZUMDER et al., 1990). No estudo *in vivo*, o mesmo fármaco antipsicótico promoveu uma diminuição na atividade da enzima com o aumento das concentrações e dos tempos de exposição aos fármacos em membranas microssomais de diferentes órgãos (MAZUMDER et al., 1990). Nossos dados são consistentes com os resultados previamente relatados na literatura, uma vez que obtivemos alterações na atividade das NTPDases após tratamento com fármacos antipsicóticos. Outra questão a ser salientada é o fato dos antipsicóticos alterarem a estrutura da membrana lipídica, o que poderia estar relacionado com as alterações observadas na atividade das NTPDases após tratamento com essas drogas.

Considerando que modificações em diversos sistemas de neurotransmissores se refletem em alterações comportamentais, cabe destacar os efeitos comportamentais relacionados com o tratamento com antipsicóticos em zebrafish. Giacomini e colaboradores (2006) demonstraram que o haloperidol e a flufenazina, ambos antipsicóticos típicos caracterizados por provocar EPS em humanos, desenvolveram movimentos defeituosos em larvas de zebrafish, em contraste com a olanzapina, a qual apresentou efeitos mínimos. Os resultados apresentados no estudo de Giacomini et al. (2006) estão de acordo com os resultados apresentados no presente estudo, no qual somente o haloperidol, único fármaco típico testado, provocou alteração na atividade da AChE no estudo *in vivo*. Na hidrólise dos nucleotídeos da adenina, o haloperidol foi capaz de inibir a hidrólise de ATP e ADP, diferente dos antipsicóticos atípicos testados. A sulpirida alterou somente a hidrólise de

ADP, enquanto que a olanzapina promoveu uma inibição significativa somente sobre a hidrólise de ATP de forma dose-dependente.

A adenosina apresenta um papel central em diversas funções do SNC, como neuroproteção e neuromodulação (FREDHOLM et al., 2005; CUNHA, 2001). A relação entre os fármacos antipsicóticos, esquizofrenia e adenosina tem sido estudada, e é evidente o potencial destes fármacos em alterar a atividade das NTPDases, bem como o importante papel da adenosina na patologia da esquizofrenia. Sabe-se que estas enzimas contribuem para a manutenção dos níveis extracelulares de ATP, ADP, AMP e adenosina. Assim, nossos resultados sugerem que o efeito inibitório observado na hidrólise de ATP e ADP após a exposição aos antipsicóticos poderia induzir um aumento nos níveis extracelulares de ATP e a consequente diminuição nos níveis de adenosina, o que contribuiria para o aspecto neurodegenerativo da esquizofrenia, uma vez que a adenosina é uma importante molécula sinalizadora do SNC.

Portanto, nossos resultados demonstram as ações induzidas por fármacos antipsicóticos de duas classes diferentes, típicos e atípicos, na atividade das ectonucleotidases e AChE em cérebro de zebrafish. Considerando que o ATP é um cotransmissor liberado junto com a ACh (BURNSTOCK, 2004) e estes dois neurotransmissores são hidrolisados na fenda sináptica pelas NTPDases e AChE, respectivamente, o estudo analisando os efeitos de diferentes fármacos antipsicóticos sobre a atividade dessas enzimas em cérebro de zebrafish poderia contribuir para um maior entendimento sobre o mecanismo de ação destes fármacos e sua influência em outros sistemas de sinalização que não estão diretamente relacionados com a ação farmacológica classicamente descrita.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que as ectonucleotidases e a acetilcolinesterase são enzimas sensíveis a intervenções farmacológicas promovidas por antipsicóticos, tanto na sua atividade quanto no padrão de expressão, promovendo ações diferenciadas de acordo com a classe de antipsicótico administrado no zebrafish. Essas alterações mostram que, além dos sistemas classicamente alterados pelos fármacos antipsicóticos, o sistema purinérgico e colinérgico também são afetados pelo tratamento com essas drogas. Portanto, as alterações transcricionais e cinéticas observadas nestas enzimas após os tratamentos com os antipsicóticos contribuíram para um melhor esclarecimento sobre os efeitos neuroquímicos desses fármacos e sugerem que o sistema purinérgico e colinérgico podem se tornar interessantes alvos para estudos farmacológicos relacionados à esquizofrenia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abi-Dargham A, Laruelle M. Mechanisms of action of second generation antipsychotic drugs in schizophrenia: insights from brain imaging studies. *Eur. Psychiatry*. 2005; 20(1):15-27.
- Ackermann GE, Paw BH. Zebrafish: a genetic model for vertebrate organogenesis and human disorders. *Front. Biosci*. 2003; 8:1227-1253.
- Agranoff BW, Albers RW, Altemus M. *Basic Neurochemistry molecular, cellular and medical aspects*. 6th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 1999.
- Amatruda JF, Shepard JL, Stern HM, Zon LI. Zebrafish as a cancer model system. *Cancer Cell*. 2002; 1: 229-231.
- Arenzana FJ, Clemente D, Sanchez-Gonzalez R, Porteros A, Aijon J, Arevalo R. Development of the cholinergic system in the brain and retina of the zebrafish, *Brain Res. Bul*. 2005; 66:421-425.
- Baptista T. Body weight gain induced by antipsychotic drugs: mechanisms and management. *Acta Psychiatr Scand*. 1999; 100: 3-16,
- 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; 10:1351-1358.
- Battie CN, Moran N. Sympathectomy alters acetylcholinesterase expression in adult heart. *Cardiovasc. Res*. 1990; 24: 335-339.
- Behra M, Cousin X, Bertrand C, Vonesch JL, Biemann D, Chatonnet A, Strähle U. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nat Neurosci*. 2002; 5(2): 111-118.
- Bertrand C, Chatonnet A, Takke C, Yan YL, Postlethwait J, Toutant JP, Cousin X. Zebrafish acetylcholinesterase is encoded by a single gene localized on linkage group 7. Gene structure and polymorphism; molecular forms and expression pattern during development. *J. Biol. Chem*. 2001; 276: 464-474.
- Best JD, Alderton WK. Zebrafish: An in vivo model for the study of neurological diseases. *Neuropsychiatr. Dis Treat*. 2008; 4(3): 567-576.
- Bilder RM, Goldman RS, Volavka J, Czobor P, Hoptman M, Sheitman B, Lindenmayer JP, Citrome L, McEvoy J, Kunz M, Chakos M, Cooper TB, Horowitz TL, Lieberman JA. Neurocognitive effects of clozapine, olanzapine, risperidone, and haloperidol in patients with chronic schizophrenia or schizoaffective disorder. *Am. J. Psychiatry* 2002; 159(6): 1018-1028.

- Brake SC, Truong A. Potentiation of beta-folding of beta-amyloid peptide 25-35 by aluminum salts. *Neuroscience Letters*. 1999; 267: 25-28.
- Broocks A, Little JT, Mrtin A, et al. The influence of ondasetron and m-chlorophenylpiperazine on scopolamine-induced cognitive, behavioral, and physiological responses in young healthy controls. *Biol Psychiatry*. 1998; 43: 408–416.
- Broughton RE, Milan JE, Roe BA. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA. *Genome Res*. 2001; 11:1958-1967.
- Brown JH, Taylor P. Pharmacological basis of therapeutics. In: Hardman JG, Limbird LE(Eds). New York. McGraw-Hill. 1996. p.141-160.
- Brunstein MG, Silveira Jr, EM, Chaves LS, Machado H, Schenkel O, Belmonte- de-Abreu P, Souza DO, Lara DR. Q2 Increased serum adenosine deaminase activity in schizophrenic receiving antipsychotic treatment. *Neurosci. Lett*. 2007; 414; (1):61–64.
- Buchanan RW, Carpenter WT. Concept of Schizophrenia. In: Sadock BJ, Sadock VA, editors. Kaplan & Sadock's comprehensive textbook of psychiatri. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2005.
- Burnstock G. In: The P2 nucleotide receptors. Turner JT, Weisman GA, Fedan JS (Eds). Humana Press, Totowa, N.J. 1998. p.3-42.
- Burnstock G. Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol*. 2004; 4:47-52.
- Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Revue de Cytologie Clinique*. 2004; 240:231–304.
- Burnstock G. Pathophysiology and Therapeutic Potential of Purinergic Signaling. *Pharmacol Rev*. 2006; 58:58–86.
- Bymaster FP. Radioreceptor binding profile of de atypical antipsychotics olanzapine. *Neuropsychopharmacology*. 1996; 14:87-96.
- Caccia S. Biotransformation of post-clozapine antipsychotics. *Clin. Pharmacokinet*. 2000; 38(5):393 – 414.
- Chan K, Delfret D, Junges K. A direct colorimetric assay for Ca²⁺ ATPase activity. *Analytical Biochemistry*. 1986; 157:375–380.
- Clemente D, Porteros A, Weruaga E, Alonso JR, Arenzana FJ, Aijon J, Arevalo R. Cholinergic elements in the zebrafish central nervous system: histochemical and immunohistochemical analysis. *J Comp Neurol*. 2004; 474: 75-107.

- Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. Acetylcholine. In: The biochemical basis of neuropharmacology. 6th ed. Oxford: Oxford University Press, 1991. p.190-213.
- Cummings JL. Cholinesterase inhibitors: a new class of psychotropic compounds. *Am J Psychiatry*. 2000; 157:4–15.
- Cunha RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int*. 2001; 38(2): 107-25.
- Deakin J, Simpson M. A two-process theory of schizophrenia: evidence from studies in post-mortem brain. *J Psychiat Res*. 1997; 31: 277–295.
- Descarries L, Gisiger V, Steriade M. Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. *Progress in Neurobiology*. 1997; 53: 603-325.
- 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*. 2002; 295 (4): 849-853.
- Diaz-Hernandez M, Pintor J, Castro E, Miras-Portugal T. Co-localization of functional nicotinic and ionotropic nucleotide receptors in isolated cholinergic synaptic terminals. *Neuropharmacology*. 2002; 24:20-33.
- Di Chiara, G., Morelli, M., Consolo, S. Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: ACh/dopamine/NMDA interactions. *Trends Neurosci*. 1994; 17(6): 228-33.
- Di Iorio P, Ballerini P, Caciagli F, Ciccarelli R. Purinoceptor-mediated modulation of purine and neurotransmitter release from nervous tissue. *Pharmacological Research*. 1998; 37:169–178.
- Dong W, Teraoka H, Yamazaki K, Tsukiyama S, Imani S, Imagawa T, Stegeman JJ, Peterson RE, Hiraga T. 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity in the zebrafish embryo: local circulation failure in the dorsal midbrain is associated with increased apoptosis. *Toxicol. Sci*. 2002; 69(1): 191- 201.
- Dooley K, Zon LI. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr. Op. Genet. Dev*. 2000; 10: 252-256.
- Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci*. 2001; 24:31-55.
- Edwards JG, Michel WC. Odor-Stimulated glutamatergic neurotransmission in the zebrafish olfactory bulb. *J. Comp. Neurol*. 2002; 454(3): 294-309.
- Egan TM, Cox JA, Voigt MM. Molecular cloning and functional characterization of the zebrafish ATP-gated ionotropic receptor P2X3 subunit. *FEBS Lett*. 2000; 475: 287-290.

- 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(7):1465-73.
- Feldman RS, Quenzer LF. *Fundamentals of neuropsychopharmacology*. Sunderland: Sinauer Associates, 1984. 528p.
- Fernandes HL, Hodges-Savola CA. Tropic regulation of acetylcholinesterase isoenzymes in adult mammalian skeletal muscles, *Neurochem. Res.* 1992; 17:115-124.
- Ferré S. – Adenosine-dopamine interactions in the ventral striatum: implications for the treatment of schizophrenia. *Psychopharmacology* 1997; 133:107-20.
- Fitzsimons J, Berk M, Lambert T, Bourin M, Dodd S. A review of clozapine safety. *Expert Opin Drug Saf.* 2005; 4(4): 731-44.
- Fredduzzi S, Moratalla R, Monopoli A, Cuellar B, Xu K, Ongini E, Impagnatiello F, Schwarzschild MA, Chen JF. Persistent behavioral sensitization to chronic L-DOPA requires A2A adenosine receptors. *J. Neurosci.* 2002; 22(3):1054-62.
- Fredholm BB. Adenosine and neuroprotection. *Int. Rev. Neurobiol.* 1997; 40:259-80.
- Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International union of pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 53(4), 527-52, 2001.
- Fredholm BB, Chen JF, Cunha RA, Svenningsson P, Vaugeois JM. Adenosine and brain function. *Int Rev Neurobiol* 2005; 63: 191-279.
- Gao ZG, Cui WY, Liu CG. Modulation of apomorphine-induced rotations in unilaterally 6-hydroxydopamine lesioned rats by cholinergic agonists and antagonists. *Life Sci.* 1997; 60(22):317-23.
- Gattaz WF, Gasser T, Beckmann H. – Multidimensional analysis of the concentrations of 17 substances in the CSF of schizophrenics and controls. *Biol Psychiatry* 1985; 20:360-6.
- Gayle RB, Maliszewski CR, Gimpel SC, Schoenborn MA, Caspary RG, Richards C, Brasel K, Price V, Drosopoulos JH, Islam N, Alyonycheva TN, Broekman MJ, Marcus AJ. Inhibition of platelet function by recombinant soluble ecto-ADPase/CD39. *The Journal of Clinical Investigation*, 1998; 101: 1851-1859.
- Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A. Drinks like a fish: zebrafish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2000; 67: 773-782.

- Gerlai R. Zebra fish: an uncharted behavior genetic model. *Behav. Genet.* 2003; 33(5): 461-468.
- Gerlai R, Lee V, Blaser R. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2006; 85(4): 752-761.
- Giacomini NJ, Rose B, Kobayashi K, Guo S. Antipsychotics produce locomotor impairment in larval zebrafish. *Neurotoxicol Teratol.* 2006; 28(2): 245-50.
- Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4(5):504-12, 2004.
- Gomez J, Zhang L, Kostenis E, Felder C, Bymaster F, Brodtkin J, Shannon H, Xia B, Deng C, Wess J. Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M(4) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(18):10483-8.
- Gregory M, Jagadeeswaran P. Selective labeling of zebrafish thrombocytes: quantitation of thrombocytes function and deletion during development. *Blood Cells Mol Dis.* 2002; 29: 286-295.
- Grosell M, Wood CM. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *J. Exp. Biol.* 2002; 205: 1179-1188.
- Gründer G, Carlsson A, Wong DF. Mechanism of new antipsychotic medications. Occupancy is not just antagonism. *Arch Gen Psychiatry* 2003; 60: 974-7.
- Guo S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: What can we learn from zebrafish? *Genes brain Behav.* 2004; 3: 63-74.
- Häfner H, an der Heiden W, Behrens S, Gattaz WF, Hambrecht M, Löffler W, Maurer K, Munk-Jørgensen P, Nowotny B, Riecher-Rössler A, Stein A. Causes and consequences of the gender difference in age at onset of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 1998; 24(1): 99-113. Review.
- Heimer L. A new anatomical framework for neuropsychiatric disorders and drug abuse. *Am. J. Psychiatry,* 2003; 60: 1726- 39.
- Hill A, Howard CV, Strahle U, Cossins A. Neurodevelopmental defects in zebrafish (*Danio rerio*) at environmentally relevant dioxin (TCDD) concentrations. *Toxicol. Sci.* 2003; 76(2): 392-399.
- Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci.* 2005; 86(1): 6-19.
- Hippius H. The history of clozapine. *Psychopharmacology.* 1989; 99:S3-S5.

- Huang BH, Hsia CP, Chen CY. Sulpiride induced torsade de pointes. *International Journal of Cardiology*. 2007; 118(3): 100-102.
- Ichikawa J, Chung YC, Li Z, Dai J, Meltzer HY. Cholinergic modulation of basal and amphetamine-induced dopamine release in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Brain Res*. 2002;958(1):176-84.
- Illes P, Ribeiro JA. Molecular physiology of P2 receptor in the central nervous system. *Eur.J.Pharmacol*. 483, 5-17, 2004.
- Ivetac I, Becanovic J, Krishnapillai V. Zebrafish: Genetic tools and genomics. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. 2000; 8:1–11.
- Jones HM, Pilowsky LS. Dopamine and antipsychotic drug action revisited. *The Royal College of Psychiatrists*. 2002; 181: 271-275.
- Kapczinski F, Quevedo J, Izquierdo I (EDS). In: *Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos*. Ed. Artes Médicas, Porto Alegre. 2000.
- Kapur S. How antipsychotics become anti-“psychotic” – from dopamine to salience to psychosis. *Trends Pharmacol. Sci*. 2004; 25: 402-6.
- Kapur S, Remington G. Dopamine D(2) receptors and their role in atypical antipsychotic action: still necessary and may even be sufficient. *Biol. Psychiatry*. 2001; 50:873-83.
- Karlovich CA, John RM, Ramirez L, Stainier DY, Myers RM. Characterization of the Huntington’s disease (HD) gene homologue in the zebrafish *Danio rerio*. *Gene*. 1998; 217:117– 125.
- Kaslin J, Panula P. Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic system in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Comp. Neurol*. 2001; 440: 342-377.
- Kenler KS. Schizophrenia: Genetics. In: Sadock BJ, Sadock VA, editors. *Kaplan & Sadock’s comprehensive textbook of psychiatry*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 1147-58.
- Kim YJ, Nam RH, Yoo YM, Lee CJ. Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci. Lett*. 2004; 355:29-32.
- Krystal JH, Anand A, Moghaddam B. Effects of NMDA receptor antagonists: implications for the pathophysiology of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*. 2002; 59: 663-664.
- Kucenas S, Li Z, Cox JA, Egan TM, Voigt MM. Molecular characterization of the zebrafish P2X receptor subunit gene family. *Neuroscience*. 2003; 121: 935–945.
- Kurumaji A, Toru M. – An increase in [3H]CGS21680 binding in the striatum of postmortem brains of chronic schizophrenics. *Brain Res*. 1998; 808:320-3.

- Lara DR, Brunstein MG, Ghisolfi ES, Lobato MI, Belmonte-de-Abreu P, Souza DO. Allopurinol augmentation for poorly responsive schizophrenia. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 2001; 16(4):235-7.
- Lara DR, Dall'Igna OP, Ghisolfi ES, Brunstein MG. Involvement of adenosine in the neurobiology of schizophrenia and its therapeutic implications. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.* 2006; 30: 617-629.
- Lara DR, Souza DO. Modelo de hipofunção adenossinérgica para a esquizofrenia: interação entre os sistemas purinérgico, glutamatérgico e dopaminérgico. *Revista Psiquiatria Clinica*, 2001; 28(3).
- Laruelle M, Abi-Dargham A. Dopamine as the wind of the psychotic fire: New evidence from brain imaging studies. *J Psychopharmacol* 1999; 13: 358–371.
- Latini S, Pedata F. Adenosine in the central nervous system: Release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem.* 2001; 79: 463–484.
- Lewis DA, Lieberman JA. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron.* 2000; 28:325-34.
- Lieberman J, Chakos M, Wu H, Alvir J, Hoffmann E, Robinson D et al. Longitudinal study of brain morphology in first episode schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2001; 6:487-99.
- Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* 2000; 8(5): 353-367.
- Lillesaar C, Tannhäuser B, Stigloher C, Kremmer E, BallycuIf L. The serotonergic phenotype is acquired by converging genetic mechanisms within the zebrafish central nervous system. *Dev. Dyn.* 2007; 236(4): 1072- 1084.
- Lloyd KG, Stadler TT, Bartholini G. Dopamine and acetylcholine neurons in limbic structures effect of neuroleptic drugs. In: Usdin E, Snyder S (Eds) *Frontiers in Catecholamine Research.* Pergamon Press, New York. 1973. p.777-779.
- Mahadik SP, Laev H, Korenovsky A, Karpiak SE. Haloperidol alters rat CNS cholinergic system: enzymatic and morphological analyses. *Biol. Psychiatry.* 1988; 24(2): 199-217.
- Maj M, Sartorius N. *Esquizofrenia.* 2ed. Porto Alegre: Artemed, 2005.
- Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Pinsky DJ, Sesti C, Levi R. Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ectonucleotidase-1: Implications for ischemic vascular diseases. *The Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2003; 305: 9-16.

- Marder SR, Van Putten T. – Antipsychotic medications. In: Schatzberg AF, Nemeroff CB (eds.) – Textbook of Psychopharmacology. American Psychiatric Press, Washington D.C. 1995. 247 – 261.
- Mazumder B, Mukherjee S, Sen PC. The chlorpromazine inhibition of transport ATPase and acetylcholinesterase activities in the microsomal membranes of rat in vitro and in vivo. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1990; 95(1): 13-20.
- Meltzer HY. Action of atypical antipsychotic drugs. *Am. J. Psychiatry*. 2002; 159(1):153-4.
- Meltzer HY, Kane J, Honigfeld G, Singer J. The Clozaril Collaborative Group. Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic. A double-blind comparison with chlorpromazine. *Arch. Gen. Psychiatry*. 1988; 45:789-96.
- Meltzer HY, Li Z, Kaneda Y, Ichikawa J. Serotonin receptors: their key role in drugs to treat schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry*. 2003; 27:1159-72.
- Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen EG, Lockridge O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase hydrolyse acetylcholine. *Neuroscience*. 2002; 110:627-639.
- Miyamoto S, Duncan Ge, Goff DC, Lieberman Já. Therapeutics of Schizophrenia. In: Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C (ed.) – *Neuropsychopharmacology: The Fifth generation of Progress*. Raven Press, Ltd. New York. 2003. 775 – 809.
- Moretto MB, Lermen cL, Morsch VM, Bohrer D, Ineu RP, Silva AC, Balz D, Schetinger MRC. Effect of subchronic treatment with mercury chloride on NTPDase, 5' nucleotidase and acetylcholinesterase from cerebral cortex of rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and biology*. 2004;17:256-260.
- Mortimer S. How do we choose between atypical antipsychotics? The advantages of amisulpride *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2004; 7(1): S21–S25.
- Moudgil VK, Kanugo MS. Effect of age of the rat on induction of acetylcholinesterase of the brain by 17 beta-estradiol. *Biochimica et Biophysica Acta* 1973; 329: 211-220.
- Ninkovic J, Bally-Cuif L. The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. *Methods*. 2006; 39(3): 262-274.
- Oda Y. Choline acetyltransferase: the structure, distribution and pathologic changes in the central nervous system. *Pathology International*. 1999; 49: 921-937.
- Parsons B, Togasaki DM, Kassir S, Przedborski S. – Neuroleptics up-regulate adenosine A2a receptors in rat striatum: implications for the mechanism and the treatment of tardive dyskinesia. *J Neurochem* 1995; 65: 2057-64.

- Porkka-Heiskanen T. Adenosine in sleep and wakefulness. *Ann Med.* 1999; 31(2):125-9.
- Postlethwait JH, Woods IG, Ngo-Hazelett P, Yan YL, Kelly PD, Chu F, Huang H, Hill-Force A, Talbot WS. Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. *Genome Res.* 2000; 10(12): 1890-1902.
- Quarta D, Ferre S, Solinas M, You ZB, Hockemeyer J, Popoli P, Goldberg SR, Opposite modulatory roles for adenosine A1 A2A receptors on glutamate and dopamine release in the shell of the nucleus accumbens. Effects of chronic caffeine exposure. *J. Neurochem.* 2004; 5:1151-1158.
- Quinn DM. Acetylcholinesterase: Enzyme structure, reaction dynamics and virtual transition states., *Chem. Rev.* 1987; 87: 955-979.
- Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Ver.* 1998; 50(3):413-92.
- Ribeiro JA, Sebastiao AM. Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends Pharmacol Sci.* 2000; 21(9):341-346.
- Ribeiro JA, Sebastiao AM, Mendonca A. Participation of adenosine receptors in neuroprotection. *Drug News Perspect.* 2003; 16(2):80-6.
- 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.* 2003; 73:2071–2082.
- Rico EP, Rosemberg DB, Senger MR, Arizi MD, Bernardi GF, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Methanol alters ectonucleotidases and acetylcholinesterase in zebrafish brain. *Neurotoxicol. Teratol.* 2006; 28 (4): 489-496.
- Rico EP, Rosemberg DB, Senger MR, Arizi MB, Dias RD, Souto AA, Bogo MR, Bonan CD. Ethanol and acetaldehyde alter NTPDase and 5'-nucleotidase from zebrafish brain membranes. *Neurochem. Int.* 2008; 52(1-2): 290- 296.
- Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signalling.* 2006; 2:409–430.
- Rosemberg DB, Rico EP, Senger MR, Arizi MB, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Acute and subchronic copper treatments alter extracellular nucleotide hydrolysis in zebrafish brain membranes. *Toxicology.* 2007; 236(1- 2) 132-139.
- Rybakowski JK, Lehman W. Decreased activity of erythrocyte membrane ATPases in depression and schizophrenia. *Neuropsychobiology.* 1994; 30: 11-4.
- Ryu S, Holzschuh J, Mahler J, Driever W. Genetic analysis of dopaminergic system development in zebrafish. *J Neural Transm Suppl.* 2006; 70: 61-66.

- Senger MR, Rico EP, Dias RD, Bobo MR, Bonan CD. Ecto-5'-nucleotidase activity in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2004; 139(2):203–207.
- Senger MR, Rico EP, Arizi MD, Rosemberg DB, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Carbofuran and Malathion inhibit nucleotide hydrolysis in zebrafish (*Danio rerio*) brain membranes. *Toxicology*. 2005; 212: 107-115.
- Senger MR, Rico EP, Arizi MD, Frazzom AP, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Exposure to Hg²⁺ and Pb²⁺ changes NTPDase and ecto- 5'-nucleotidase activities in central nervous system of zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology*. 2006; 226 (2–3): 229–237.
- Serra EL, Medalha CC, Mattioli R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1999; 32: 1551-1553.
- Shen WW. A history of antipsychotic drug development. *Compr. Psychiatry*. 1999; 40: 407–414.
- Skau KA. Acetylcholinesterase molecular forms in serum and erythrocytes of laboratory animals. *Comparative Biochemistry and Physiology – Comparative Pharmacology*. 1985; 80: 207 – 210.
- 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.
- Solinas M, Ferre S, You ZB, Karcz-Kubicha M, Popoli P, Goldberg SR. Caffeine induces dopamine and glutamate release in the Shell of the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 2002; 15: 6321-6324.
- Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*. 2001; 2:294-302.
- Spielewoy C, Roubert C, Hamon M, Nosten-Bertrand M, Betancur C, Giros B. Behavioural disturbances associated with hyperdopaminergia in dopamine-transporter knockout mice. *Behav Pharmacol.* 2000; 11: 279-290.
- Sprague J, Doerry E, Douglas S, Westerfield M. The Zebrafish Information Network (ZFIN): a resource for genetic, genomic and developmental research. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29 (1): 87-90.
- Sprague J, Clements D, Conlin T, Edwards P, Frazer K, Schaper K, Segerdell E, Song P, Sprunger B, Westerfield M. The Zebrafish Information Network (ZFIN): the zebrafish model organism database. *Nucleic Acid Res.* 2003; 31: 241-243.
- Stern HM, Zon LI. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nature Rev. Cancer.* 2003; 3:1-7.

- Strange PG. Antipsychotic drugs: Importance of dopamine receptors for mechanisms of therapeutic actions and side effects. *Pharmacol Rev.* 2001; 53:119-33.
- Sussman JL, Harell M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science.* 1991; 253: 872-879.
- Tauscher J, Hussain T, Agid O, Verhoeff NP, Wilson AA, Houle S, Remington G, Zipursky RB, Kapur S. Equivalent occupancy of dopamine D1 and D2 receptors with clozapine: differentiation from other atypical antipsychotics. *Am J Psychiatry.* 2004; 161(9):1620-5.
- Taylor P, Brown JH. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, 5^a ed., (eds. Siegel et al.). 1994. p. 231-260, Raven Press, LTDA, NY.
- Taylor P, Brown JH, 1999. Acetylcholine. In: Siegel GJ, Agranof BW, Albers RW, Molinoff PB. (Ed.). *Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and Medical Aspects*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, U.S.A, p. 214-242.
- Taylor MR, Hurley JB, Van Epps HA, Brockerhoff SE. A zebrafish model for pyruvate dehydrogenase deficiency: rescue of neurological dysfunction and embryonic lethality using a ketogenic diet. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(13): 4584-4589.
- Tessier C, Nuss P, Staneva G, Wolf C. Modification of membrane heterogeneity by antipsychotic drugs: an X-ray diffraction comparative study. *J Colloid Interface Sci.* 2008; 320(2): 469-75.
- Tran PV, Hamilton SH, Kintz AJ, Potvin JH, Andersen SW, Beasley C, Tollefson GD. Double-blind comparison of olanzapine versus risperidone in the treatment of schizophrenia and other psychotic disorders. *J. Clin. Psychopharmacol* 1997; 17(5):407-18.
- Tsukada H, Harada N, Nishiyama S, Ohba H, Kakiuchi T. Cholinergic Neuronal Modulation Alters Dopamine D₂ Receptor Availability *In Vivo* by Regulating Receptor Affinity Induced by Facilitated Synaptic Dopamine Turnover: Positron Emission Tomography Studies with Microdialysis in the Conscious Monkey Brain. *The Journal of Neuroscience.* 2000; 20(18):7067-7073.
- Undie AS, Friedman E. Differences in the cataleptogenic actions of SCH 23390 and selected classical neuroleptics. *Psychopharmacology.* 1988; 96: 311-316.
- Ushijima I, Kawano M, Kaneyuki H, Suetsugi M, Usami K, Hirano H, Mizuki Y, Yamada M. Dopaminergic and cholinergic interaction in cataleptic responses in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1997; 58(1):103-108.
- Vianna EPM, Ferreira AT, Dona F, Cavalheiro EA, Fernandes MJ. Modulation of seizures and synaptic plasticity by adenosinergic receptors in an experimental model of

- temporal lobe epilepsy induced by pilocarpine in rats. *Epilepsia*. 2005; 46(5):166-173.
- Vitiello B, Martin A, Hill J, et al. Cognitive and behavioral effects of cholinergic, dopaminergic, and serotonergic blockade in humans. *Neuropharmacology*. 1997; 16:15–24.
- Xie HQ. et al. Regulation of a transcript encoding the proline-rich membrane anchor of globular muscle acetylcholinesterase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282(16):11765-11775.
- Zimmerman G, Soreq H. Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell Tissue Research*. 2006; 326:655-669.
- Zimmermann H. 5'-nucleotidase-molecular structure and functional aspects. *The Biochemical Journal*. 1992; 285:345-365.
- Zimmermann H. Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol*. 1996; 49:589-618.
- Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Arch Pharmacol*. 2000; 362:299-309.
- Zimmermann H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev. Res*. 2001; 52: 44-56.
- Zimmermann H, Braun N, Kegel B, Heine P. New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. *Neurochem Int* 1998; 32(5-6):421-5.
- Zirger JM, Beattie CE, McKay DB, Boyd RT. Cloning and expression of zebrafish neuronal nicotinic acetylcholine receptors, *Gene Expr. Patt*. 2003; 3:747-754.
- Waziri R, Baruah S, Sherman AD – Abnormal serine-glycine metabolism in the brains of schizophrenics. *Schizophr Res*. 1993; 8: 233-43.
- Weinberger DR. From Neuropathology to neurodevelopment. *Lancet* 1995; 346:552-57.
- Weisman GA, Erb L, Garrad RC. P2Y nucleotide receptors in the immune systems: Signalling by a P2Y₂ receptor in U937 monocytes. *Drug Development Research*, , 1998; 45:222-228.
- Westerfield M. 2000. *The zebrafish Book: A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)* (4th ed.). Eugene, OR: University of Oregon Press. Weinberger DR. From Neuropathology to neurodevelopment. *Lancet* 1995, 346: 552-57.
- Wolff MC, Leander JD. Comparison of the effects of antipsychotics on a delayed radial maze task in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 2003; 168(4): 410-6.

Worrel JA, Marken PA, Beckman SE, Ruehter VL. Atypical antipsychotic agents: a critical review. *Am J Health-syst Pharm.* 2000; 57:238-255.