

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

**EFEITO DO ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL NO METABOLISMO DE  
NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEOS EM ENCÉFALO DE *ZEBRAFISH*  
(*Danio rerio*)**

FERNANDA FRANCINE ZIMMERMANN

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr. Carla Denise Bonan

Co-orientadora: Dr. Giana de Paula Cognato

Porto Alegre - RS

Março, 2013

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

**EFEITO DO ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL NO METABOLISMO DE  
NUCLEOTÍDEOS E NUCLEOSÍDEOS EM ENCÉFALO DE *ZEBRAFISH*  
(*Danio rerio*)**

FERNANDA FRANCINE ZIMMERMANN

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr. Carla Denise Bonan

Co-orientadora: Dr. Giana de Paula Cognato

Dissertação apresentada como requisito para a  
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.

Porto Alegre - RS

Março, 2013

Dedico este trabalho a minha família, pelo amor  
incondicional e eterno incentivo.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer as pessoas especiais que me acompanharam durante a realização desta jornada:

À Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força e pelos momentos de alegrias.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Carla Denise Bonan, por acreditar no meu potencial e ajudar a superar as minhas inseguranças. Obrigada pela sua orientação, incentivo, paciência, apoio e carinho. Tenho um orgulho imenso de ter a tua orientação.

Aos meus amados pais, Fernando Zimmermann e Maristela Leila Bauer Zimmermann, agradeço, primeiramente, ao eterno amor de vocês, e pela força, preocupações, carinho e incentivo para que fosse possível esta conquista. Obrigada por estarem ao meu lado sempre que precisei!

A toda minha família e amigos, meu irmão Ludiero Zimmermann, meus queridos avós e tios, agradeço, pelo carinho, apoio, incentivo e companhia!

Às amigas, Stefani Altenhofen, Giana Cognato, Josiane Bortolotto e Laura Roesler, obrigada por estarem presentes ao longo desta caminhada, pela ajuda nos momentos difíceis, pelas risadas e alegrias.

Aos colegas de laboratório pelo companheirismo e por tornarem o ambiente de trabalho tão alegre e motivante.

Aos professores Dra. Mônica Ryff Moreira Vianna, Dra. Rosane Souza da Silva, Dr. Maurício Reis Bogo e Dr. Diogo Rizzato Lara pelos conhecimentos e apoio.

A CAPES pela bolsa de estudos concedida.

*“Todos os nossos sonhos podem tornar-se realidade  
se tivermos a coragem de persegui-los”*

*Walt Disney*

## RESUMO

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), atualmente o estresse afeta mais de 90% da população mundial, sendo considerado uma epidemia global. O estresse tornou-se parte integrante da vida humana e os organismos são constantemente submetidos a estímulos estressantes que alteram vários processos fisiológicos, sendo um fator de risco para diversas patologias, como câncer, doenças cardiovasculares, metabólicas, infecciosas, gastrointestinais e depressão. O peixe-zebra (*Danio rerio*) tem muitas semelhanças com mamíferos em termos de organização geral e o funcionamento dos respectivos sistemas reguladores do estresse. O eixo hipotálamo-pituitária-interrenal (HPI), um sistema análogo ao eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), foi descrito em *zebrafish* e a ativação desta via é essencial para a manutenção das funções vitais como resposta a eventos estressantes. Apesar do amplo conhecimento das respostas do estresse em mamíferos, os dados sobre a relação entre o estresse crônico imprevisível e seus efeitos na sinalização purinérgica são limitados. A sinalização purinérgica é mediada por ATP e adenosina por meio da ativação dos receptores P2 e P1, respectivamente. O catabolismo de ATP extracelular até adenosina é promovido pelas ectonucleotidases, como as Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases) e Ecto-5'-nucleotidases (E-5'NT). A adenosina produzida pode ser desaminada pela adenosina desaminase (ADA), produzindo inosina. Assim, estas enzimas controlam os níveis de nucleosídeos e nucleotídeos extracelulares, exercendo uma influência na sinalização purinérgica. Considerando que alguns modelos de estresse podem afetar os sistemas de sinalização, o objetivo deste estudo foi verificar se o estresse crônico imprevisível altera as atividades ectonucleotidásicas e adenosina desaminase em cérebro de *zebrafish*. Além disso, analisamos o metabolismo do ATP, bem como a expressão de genes relacionados à ADA, *ada1*, *ada2.1*, *ada2.2*, *adaL*, *adaasi* e os efeitos de agonistas e antagonistas de receptores de adenosina em *zebrafish* submetidos a um modelo de estresse crônico imprevisível. Nossos resultados demonstraram que não há alterações na hidrólise de ATP ( $P = 0.1499$ ), ADP ( $P = 0.3615$ ) e AMP ( $P = 0.8987$ ) em membranas cerebrais de *zebrafish* submetidos ao estresse crônico imprevisível. Em contraste, a atividade da ecto-ADA diminuiu significativamente (26,8%;  $8.164 \pm 0,78 \text{ NH}_3 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína;  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ) em membranas de cérebro de animais expostos ao estresse crônico imprevisível quando comparado ao grupo controle ( $11.15 \pm 2,16 \text{ NH}_3 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína;  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ). No entanto, a atividade da ADA citosólica não foi alterada. A análise quantitativa por RT-qPCR não apresentou alterações significativas após a exposição do estresse crônico imprevisível na expressão gênica nos genes *ada1*, *ada2.1*, *ada2.2*, *adaL*, *adaasi*. O metabolismo do ATP em preparações de membrana de cérebro de *zebrafish* no grupo controle e estressado foi medido por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e mostrou um aumento significativo de adenosina nos animais estressados. Considerando que os agonistas de receptores  $A_1$  têm uma atividade ansiolítica e os antagonistas dos receptores  $A_{2A}$  podem exercer efeitos neuroprotetores, investigamos o efeito da administração de um agonista do receptor  $A_1$ ,  $N^6$ -ciclopentiladenosina (CPA), e de um antagonista de receptores  $A_{2A}$ , (ZM241385) em parâmetros comportamentais de animais submetidos ao estresse crônico imprevisível, para verificar uma possível relação entre o sistema adenosinérgico e o estresse. Como resultado, observamos que esses compostos não foram capazes de reverter o efeito ansiogênico causado pelo estresse crônico imprevisível. Uma vez que a adenosina tem efeitos neuromodulatórios, as alterações nos níveis de adenosina podem desempenhar um papel nos mecanismos relacionados ao estresse, representando um mecanismo de compensação a fim de restaurar a homeostase.

**Palavra-chave:**

Adenosina; Adenosina deaminase; Ectonucleotidases; Estresse crônico imprevisível;  
*Zebrafish*.

## ABSTRACT

According to data from the World Health Organization (WHO), stress affects more than 90% of the world's population and is considered a global epidemic. Stress has become an integral part of human life and organisms are constantly subjected to stressful stimuli that change various physiological processes, representing a risk factor for many diseases, such as cancer, cardiovascular, metabolic, infectious and gastrointestinal diseases and depression. The *zebrafish* (*Danio rerio*) has many similarities with mammalian in terms of overall organization and the functioning of their stress regulatory systems. The *zebrafish* hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI), analogous to the mammalian hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA), has been found in *zebrafish* and the activation of this pathway is essential for the maintenance of vital functions in response to stressful events. Despite extensive knowledge regarding stress responses in mammals, data on the relationship between chronic unpredictable stress and its effects on purinergic signaling is limited. Purinergic signaling is mediated by ATP and adenosine receptor activation through P2 and P1, respectively. The catabolism of extracellular ATP to adenosine is promoted by the ectonucleotidases, such as Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases) and ecto-5'-nucleotidases (E-5'NT). Adenosine is deaminated by adenosine deaminase (ADA) producing inosine. Thus, these enzymes control the levels of extracellular nucleotides and nucleosides, exerting an influence on purinergic signaling. Considering some models of stress can affect the signalling systems, the objective of this study was to verify whether the unpredictable chronic stress changes ectonucleotidases and adenosine deaminase activities in *zebrafish* brain. In addition, we analyzed the metabolism of ATP as well as the expression of genes related to ADA, *ada1*, *ada2.1*, *ada2.2*, *adaL*, *adaasi* and the effects of agonists and antagonists of adenosine receptors in an unpredictable chronic stress model in *zebrafish*. Our results demonstrated that there are no changes on ATP ( $P = 0.1499$ ), ADP ( $P = 0.3615$ ) and AMP ( $P = 0.8987$ ) hydrolysis in *zebrafish* brain membranes submitted to unpredictable chronic stress. In contrast, ecto-ADA activity significantly decreased (26.8%;  $8,164 \pm 0.78 \text{ NH}_3 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  of protein;  $p < 0.05$ ;  $n = 5$ ) in brain membranes of animals exposed to the unpredictable chronic stress when compared to the control group ( $11.15 \pm 2.16 \text{ NH}_3 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  of protein;  $p < 0.05$ ;  $n = 5$ ). However, the activity of cytosolic ADA was not changed after the unpredictable chronic stress. Quantitative analysis by RT-qPCR did not show significant changes after chronic unpredictable stress exposure on gene expression in the genes *ada1*, *ada2.1*, *ada2.2*, *adaL*, *adaasi*. ATP metabolism in brain membrane preparations of *zebrafish* in the control group and stressed was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) and showed a significant increase of adenosine in stressed animals. Considering adenosine  $A_1$  receptor agonists have an anxiolytic activity and the  $A_{2A}$  receptor antagonists can exert neuroprotective effects, we investigated the effect of administration of an agonist of  $A_1$  receptor,  $N^6$ -ciclopentiladenosine (CPA), and an antagonist of  $A_{2A}$  receptors, (ZM241385) on behavioral parameters of animals submitted to unpredictable chronic stress to check a possible relationship between the adenosinergic system and the stress. As a result we showed that these compounds have not been able to reverse the anxiogenic effect caused by unpredictable chronic stress. Since adenosine has neuromodulatory and anxiolytic effects, changes in its levels could play a role in counteracting the stress, which could be related to a compensatory mechanism in order to restore the homeostasis.

### Keywords:

Adenosine; Adenosine deaminase; Ectonucleotidases; Unpredictable chronic stress; *Zebrafish*.



## LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH: hormônio adrenocorticotrófico

ADA: adenosina desaminase

ADO: adenosina

ADP: adenosina 5'-difosfato

AK: adenosina quinase

AMP: adenosina 5'-monofosfato

AMPC: adenosina 5'- monofosfato cíclico

ARS: estresse agudo por retração (do inglês *acute restraint stress*)

ATP: adenosina 5'-trifosfato

CRH: hormônio de liberação de corticotrofina

Ecto-5'-NT: ecto-5'-nucleotidase

E-NPP: ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase

E-NTPDase: ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

GR: receptor glicocorticóide

HPA: hipotálamo-pituitária-adrenal

HPI: hipotálamo-pituitária-interrenal

NTPDase: nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

UCS: estresse crônico imprevisível (do inglês *unpredictable chronic stress*)

SNC: sistema nervoso central

SNS: sistema nervoso simpático

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação geral do eixo HPI .....	21
<b>Figura 2:</b> Família de receptores purinérgicos .....	31

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Agonistas e antagonistas de receptores adenosinérgicos .....	29
<b>Tabela 2:</b> Esquema das tarefas do modelo de estresse crônico imprevisível.....	68

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 .....	13
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....	13
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 ESTRESSE .....	14
1.2 ZEBRAFISH (Danio rerio).....	17
1.3 ESTRESSE EM ZEBRAFISH .....	20
1.4. SISTEMA PURINÉRGICO .....	24
1.5 ECTONUCLEOTIDASES .....	29
1.6 ADENOSINA DEAMINASE .....	33
2. OBJETIVOS.....	35
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
CAPÍTULO 2 .....	36
ARTIGO CIENTÍFICO.....	36
CAPÍTULO 3 .....	66
RESULTADOS ADICIONAIS.....	66
CAPÍTULO 4 .....	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	80

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 ESTRESSE

Os primeiros estudos sobre estresse foram evidenciados no final do século XIX pelo cientista Louis Pasteur, o qual demonstrou, experimentalmente, que galinhas expostas a condições estressantes eram mais suscetíveis a infecções bacterianas que galinhas não estressadas. Hans Selye é considerado pioneiro nos estudos sobre estresse, pois deu origem a diversas teorias e definições sobre o assunto (Szabo et al., 2012). Desde então, o estresse é considerado um fator de risco para diversas patologias, como câncer, doenças cardiovasculares, metabólicas, infecciosas, gastrointestinais e depressão (Lee et al., 2002; Juruena et al., 2003). De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2012), atualmente o estresse afeta mais de 90% da população mundial, sendo considerado uma epidemia global. O estresse se tornou uma parte integrante da vida humana e os organismos são constantemente submetidos a estímulos estressantes que afetam vários processos fisiológicos. Estresse é definido como um estado onde a homeostase é ameaçada, após a exposição a fatores extrínsecos ou intrínsecos. A fim de reestabelecer o equilíbrio perturbado pelo agente estressor, um repertório de respostas fisiológicas e comportamentais é rapidamente mobilizado, constituindo a resposta do esforço adaptativo ou resposta adaptativa ao estresse (Chrousos, 2009; Kyrou & Tsigos, 2009; Groeneweg et al., 2011). Goldstein (2010) divide o termo “stress” em três componentes principais: estressores, que são os estímulos que perturbam a homeostase; estresse, sendo o que o cérebro percebe quando é confrontado com uma alteração da homeostase; e a resposta ao estresse, que é eliciada pelo cérebro como resposta à alteração observada (Goldstein, 2010).

Hans Selye popularizou o estresse como uma ideia científica médica e definiu como “uma resposta inespecífica do corpo a qualquer demanda sobre ele” (Selye, 1976). A inespecífica, foi descrita pelo autor como um elemento compartilhado, independentemente da natureza da demanda ou estressor. Selye propôs três estágios universais de lidar com um estressor - a “síndrome de adaptação geral” - uma fase inicial de alarme, análoga à resposta de “luta ou fuga” proposta por Cannon (1929), uma fase de adaptação, com resistência ao estressor e, eventualmente, um estágio de exaustão, podendo até mesmo levar a morte. Chrousos & Gold (1992) modificaram a teoria de Selye da não-especificidade, propondo que, acima de uma intensidade limiar, qualquer estressor provoca a síndrome de estresse. Atualmente, o estresse é conceituado como uma ameaça para a homeostase (McEwen & Stellar, 1993; Goldstein & McEwen, 2002), em que a resposta tem um grau de especificidade, dependendo do desafio para reestabelecer a homeostase e do significado do estressor, de que forma é percebido pelo organismo e da capacidade de lidar com o estressor (Goldstein, 2001). Uma visão alternativa, mais recente do estresse está relacionada com o conceito de alostase e carga alostática (Karatsoreos & McEwen, 2011). Alostase é o processo de manutenção da estabilidade (homeostase) por ação dos hormônios e mediadores do estresse, enquanto que carga alostática é quando ocorre o desgaste do corpo e cérebro, causado pelo uso da alostase, particularmente quando os mediadores estão desregulados (McEwen, 2007). Selye demonstrou que esses eventos estão associados à ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em animais e humanos (Selye, 1976; Szabo et al., 2012). O eixo HPA e o sistema nervoso simpático (SNS) constituem as principais vias efetoras do sistema de estresse, mediando as funções adaptativas. Neste contexto, a atenção é reforçada e as funções do cérebro se concentram principalmente na ameaça percebida. Somaticamente, o débito cardíaco e a respiração estão acelerados, o catabolismo é aumentado e o fluxo do sangue é redirecionado para, temporariamente, prestar maior perfusão aos locais ameaçados e estimular

o cérebro, coração e músculos (Hirsch & Zukowska, 2012). Essas respostas são normalmente transitórias e visam maximizar as chances do indivíduo sobreviver. No entanto, quando cronicamente estimulada, a resposta adaptativa ao estresse pode tornar-se inadequada com consequências potencialmente prejudiciais (McEwen, 1998). De fato, agentes estressores excessivos e/ou cronicamente expostos podem prejudicar uma série de funções fisiológicas essenciais, tais como o metabolismo, crescimento, reprodução e imunocompetência, bem como o desenvolvimento da personalidade e do comportamento (Kyrou & Tsigos, 2009).

De modo geral, a resposta ao estresse é benéfica ao organismo, em um curto período, porque a energia armazenada é mobilizada e redistribuída para enfrentar o agente estressor. No entanto, por um longo período, a resposta ao estresse prejudica as funções vitais, como crescimento, reprodução e sistema imune. Como foi proposto por Selye em 1936, o estresse intenso superativa o eixo HPA, promovendo um estado de exaustão que leva a desregulação de mediadores do estresse, patologias e até mesmo morte (Selye, 1936; Kvetnansky et al., 2009).

O estresse crônico induz uma liberação excessiva de glicocorticóides que perturba a homeostase do organismo e está implicado na etiopatogenia de uma variedade de doenças, incluindo hipertensão, doenças cardíacas coronarianas, úlcera gástrica, diabetes, imunossupressão, depressão e perda da memória (Fitzpatrick et al., 1992; Yadin & Thomas, 1993; Purrel, 2001, Roy et al., 2001; Bhatia et al., 2011). O estresse promove uma variedade de alterações fisiológicas (Ruys et al., 2004; Levine, 2005; Bao et al., 2008; Harvey et al., 2008; Gorzalka et al., 2008; Tabarin et al., 2007), imunológicas (Swaab et al., 2005), endócrinas (Lemaire et al., 2000), em processos de desenvolvimento (Canu et al., 2007) e patologias psicossociais em humanos (Joëls & Baram, 2009). A exposição a situações estressantes ativa sistemas hormonais que ajudam o organismo a se adaptar. Os hormônios do estresse, principalmente os glicocorticóides, levam à adaptação, afetando órgãos periféricos e



a função e as estruturas cerebrais (Joëls, 2011; de Kloet, 2005). Uma das maneiras pelas quais esses hormônios modulam a função cerebral é alterando as estruturas neuronais (McEwen, 2008). O estresse crônico exerce efeitos profundos sobre a estrutura e a função dos neurônios, como por exemplo, do sistema límbico. O impacto do estresse crônico não é simplesmente um efeito cumulativo do que é visto após exposição ao estresse agudo. Árvores dendríticas são expandidas em algumas regiões, mas reduzidas em outras (Joëls et al, 2007). Magarinos & McEwen (1995) demonstraram que o tratamento prolongado com corticosterona ou a exposição ao estresse resulta em alterações estruturais das células dendríticas hipocâmpais na região CA3. Outro estudo demonstrou que, de forma geral, as células são expostas a uma maior carga de cálcio após a despolarização (Karst e Joëls, 2007), mas mostram respostas atenuadas a serotonina (Karten et al, 1999). Esses efeitos celulares, após o estresse crônico, podem ser adaptativos e poderiam contribuir para o desenvolvimento de psicopatologias e alterações em diversos sistemas de neurotransmissão, como ocorre na transmissão glutamatérgica, que é alterada após o estresse (Kole et al, 2002). O envolvimento de vários sistemas de neurotransmissores já foi estudado em diversos modelos animais submetidos ao estresse em diferentes protocolos (Das et al., 2005; Buynitsky & Mostofsky, 2009; Griffiths et al., 2012).

## 1.2 ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

*O zebrafish* está firmemente estabelecido como um organismo modelo de pesquisa para muitas áreas da biologia, genética, biologia do desenvolvimento, neurofisiologia, medicina, investigação de doenças humanas e para a descoberta e desenvolvimento de medicamentos (Rubinstein, 2003; Amsterdam & Hopkins, 2006; Beliaeva et al., 2010; Liu & Leach, 2011), oncologia, imunologia, farmacologia e toxicologia (Jia & Meng, 2012). É um

dos mais importantes modelos de vertebrados e tem um papel cada vez mais expressivo na área da pesquisa (Xin et al., 2012). O *zebrafish*, também conhecido como paulistinha ou peixe-zebra, é um pequeno teleósteo (3-4 cm) que pertence à família Cyprinidae, que foi originalmente encontrado em plantações de arroz adjacentes ao rio Ganges na Índia (Liu & Leach, 2011). O foco da pesquisa com *zebrafish* inicialmente estava na área de biologia do desenvolvimento, refletindo as diversas vantagens que o tornam interessante para a realização de pesquisas, tais como: um ciclo de vida curto, rápido desenvolvimento, embriões transparentes, fecundação e reprodução externas, requer pouco espaço para manutenção, baixo custo e fácil observação comportamental (Beliaeva et al., 2010; Fleming & Rubinsztein, 2011; Liu et al., 2011).

O genoma do *zebrafish* foi totalmente sequenciado sendo comparativamente mais fácil o rastreo genético em grande escala para investigar doenças humanas relevantes, como a epilepsia, doença de Alzheimer e doença de Parkinson, doença renal policística e câncer quando comparado com outros modelos animais, como ratos (Xia et al., 2012). Além disso, mostrou-se que o genoma do *zebrafish* possui semelhanças com o genoma humano (Barbazuk et al., 2000). Novas tecnologias e o conhecimento sobre o genoma do *zebrafish* permitem o desenvolvimento e melhoria de estratégias sofisticadas como a geração de mutantes, manipulação genética e tecidual, morfólino e tecnologia de microarranjos (Rico et al., 2011; Xia et al., 2012). Para tais pesquisas, a utilização deste modelo que absorve os componentes diretamente da água pelas suas brânquias e acumula-os em diferentes tecidos, principalmente no SNC (Grosell & Wood, 2002) vem ganhando importância significativa (Froehlicher et al., 2009; Yang et al., 2009), bem como para estudos toxicológicos (Hill et al., 2005). Além disso, o *zebrafish* tem sido utilizado como modelo para estudo de várias doenças neurodegenerativas humanas (Fleming & Rubinsztein, 2011).

As características únicas do *zebrafish* permitem sua utilização em áreas como a neurociência, pois esta espécie é uma excelente ferramenta para a análise dos complexos mecanismos do sistema nervoso central, já que o *zebrafish* apresenta um sistema nervoso desenvolvido (Panula et al., 2006). Durante a última década, muitos sistemas de neurotransmissão excitatórios e inibitórios foram mapeados no sistema nervoso do *zebrafish*, tais como, sistemas dopaminérgico, serotoninérgico, colinérgico, purinérgico, histaminérgico, nitrérgico, glutamatérgico, glicinérgico e gabaérgico, enfatizando suas características como alvos farmacológicos e toxicológicos (Panula et al., 2010; Rico et al., 2011).

A arquitetura dos principais sistemas cerebrais do *zebrafish* se assemelha à dos mamíferos, apesar das diferenças no desenvolvimento do telencéfalo e diencéfalo (Panula et al., 2010). Há um interesse crescente em utilizá-lo em estudos comportamentais, visando à compreensão da base genética do comportamento (Gerlai, 2003; Guo, 2004; Miklósi & Andrew, 2006). O repertório comportamental do *zebrafish* é diversificado e permite a análise de uma série de parâmetros (Gerlai et al., 2000; Miklósi & Andrew, 2006) que podem ser facilmente observados e quantificados. Os aspectos comportamentais incluem alterações na locomoção, como movimentos erráticos, interação social, distância percorrida, tempo de permanência e latência em distintos compartimento (Rico et al., 2011). Além disso, foi caracterizada uma série de comportamentos relacionados à ansiedade que podem ser associados ao estresse (Levin et al., 2007; Bencan et al., 2009; Champagne et al., 2010). O *zebrafish* tem uma tendência natural para inicialmente permanecer na parte inferior de um ambiente novo e, subsequentemente de forma gradual, explorar as partes superiores na coluna d'água do tanque teste (Egan et al., 2009). A coesão do cardume, diminuição do tempo na parte superior do tanque, aumento dos movimentos erráticos e *freezing* estão relacionados com a resposta à ansiedade do *zebrafish* (Egan et al., 2009).

### 1.3 ESTRESSE EM ZEBRAFISH

O *zebrafish* possui alto grau de similaridades com vertebrados terrestres em termos de genoma, padrão cerebral, estrutura, funções neuroquímicas e sistemas comportamentais, bem como a organização e funcionamento de seu sistema de regulação de estresse (Champagne et al., 2010).

O eixo hipotálamo-pituitária constitui uma relação fisiológica e anatômica entre o sistema nervoso central (SNC), representado pelo hipotálamo, e o sistema endócrino, representado pela pituitária. A pituitária regula processos fisiológicos básicos, como a homeostase corporal e reprodução. Este eixo pode envolver outras glândulas, como a adrenal em mamíferos (Alsop & Vijayan, 2009a). Em *zebrafish*, o sistema de estresse é descrito pelo eixo hipotálamo-pituitária-interrenal (HPI), o qual já foi caracterizado em detalhes (Alsop & Vijayan, 2008; 2009a,b; Alderman & Bernier, 2009). Similarmente ao eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) de mamíferos, o eixo HPI em *zebrafish* é responsável por controlar os níveis de cortisol na circulação. De modo diferente da clara separação do córtex e medula adrenal, no peixe as células esteroidogênicas e cromafins da glândula interrenal estão misturadas e fixadas na cabeça do rim. Apesar destas diferenças anatômicas no posicionamento e organização da glândula, o desenvolvimento da linhagem de células esteroidogênicas é bem conservado (Grassi Milano et al., 1997; Löhr & Hammerschmidt, 2011). Este sistema de sinalização assemelha-se ao sistema neuroendócrino humano em complexidade e utilização do cortisol (ao contrário da corticosterona em roedores), o que reforça a contribuição do *zebrafish* nos estudos sobre neurobiologia do estresse (Alsop & Vijayan, 2008).

A ativação deste eixo inicia no hipotálamo, o qual recebe sinais transmitidos do sistema nervoso central e periférico. Sinais estressores estimulam os nervos hipotalâmicos na

área pré-óptica para secretar o hormônio de liberação de corticotrofina (CRH). Em resposta ao CRH, a pituitária libera o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea que alcança os rins do peixe. Em seguida, o cortisol é secretado e liga-se ao seu receptor glicocorticóide (GR), ativado pelo fator de transcrição nuclear (Mommsen et al., 1999) (Figura 1). Os efeitos das catecolaminas, indiretamente, incluem a mobilização de glicose do fígado e músculos, aumento da captação de oxigênio pelas brânquias e aumento da transferência de oxigênio para os tecidos; todos esses efeitos fisiológicos proporcionam energia extra para enfrentar os agentes estressores (Löhr et al., 2011).

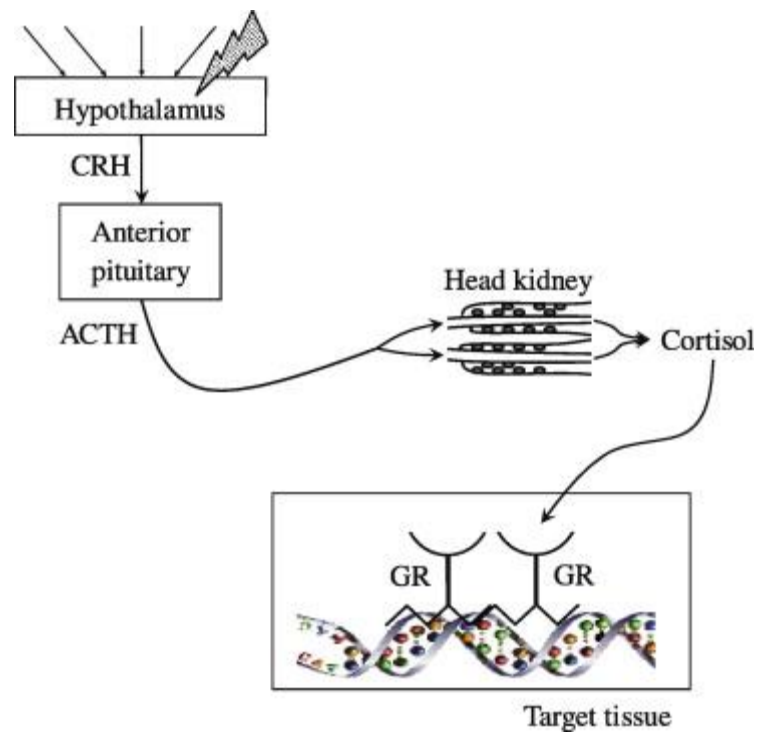


Figura 1: Representação esquemática do eixo HPI. Após a exposição a um estressor, o hipotálamo segrega CRH na área da hipófise anterior. Em resposta, ocorre a liberação de ACTH para a circulação, o que estimula a síntese de cortisol e secreção pelas células interrenais do rim do peixe. O cortisol se liga ao receptor de glicocorticóide (GR) e regula a expressão de genes-alvo. Figura obtida de Alsop & Vijayan, 2009.

O estresse pode ser caracterizado por induzir alterações nos níveis de ansiedade, comportamento exploratório e memória. Esses parâmetros comportamentais simples possibilitam analisar alterações comportamentais induzidas por diferentes tratamentos farmacológicos. O *zebrafish* apresenta um elaborado conjunto comportamental de respostas ao estresse por contenção (agudo). Ghisleni et al. (2012) demonstraram que, após o estresse por contenção (agudo), ocorre um aumento na atividade locomotora, alteração no padrão do nado, ansiedade, mudanças nos níveis de cortisol correspondentes às alterações comportamentais e mudanças na expressão do hormônio de liberação de corticotrofina hipotalâmico (CHR). Piatto et al. (2011b) desenvolveram um protocolo que permite avaliar simultaneamente a coesão do cardume, cor do peixe, altura do tanque e locomoção, que são parâmetros relacionados com a ansiedade no *zebrafish*. Verificou-se um aumento na ansiedade e uma coloração mais escura nos animais estressados quando comparados aos animais do grupo controle, mas não houve alterações na locomoção e cognição. Além de este modelo induzir um comportamento do tipo ansioso, após 14 dias de estresse podem ser observadas características de um comportamento depressivo. O modelo de estresse crônico é classicamente utilizado como um modelo de depressão, pois eventos cronicamente estressantes podem ter um impacto substancial sobre as funções e estruturas cerebrais, podendo resultar no desenvolvimento de desordens psiquiátricas, como a depressão (Wu et al., 2013). A depressão é uma doença que pode ser induzida por estresse e há evidências do envolvimento do eixo HPA na doença. Uma hiperatividade crônica do eixo HPA e a liberação excessiva de glicocorticóides (hipercortisolismo) pode induzir à depressão (Kunugi et al., 2012).

Além dos modelos de estresse agudo, existem modelos animais de estresse crônico, principalmente em roedores (Yalcin et al., 2008; Hong et al., 2013; Liu et al., 2013; Smirnov et al., 2013). Nesses modelos de estresse crônico, os ratos podem desenvolver uma adaptação

quando são repetidamente expostos a um estressor previsível. No entanto, isso não ocorre quando os animais são expostos ao estresse crônico imprevisível (Wu et al., 2012). O estudo desta condição utilizando o protocolo de estresse crônico imprevisível no *zebrafish* ainda é superficial. Piatto et al. (2011a) apresentou um protocolo de estresse crônico imprevisível (UCS) que mimetiza algumas modificações comportamentais e fisiológicas, desencadeadas em roedores e seres humanos. O protocolo de estresse crônico imprevisível apresenta vantagens como modelo de estresse, pois produz claramente alterações comportamentais e neuroendócrinas, tais como: aumento nos níveis de ansiedade, altera a interação social, ativa o eixo HPI e aumenta os níveis de cortisol. Além disso, causa um prejuízo na função cognitiva, aumento do CRH, enquanto há diminuição da expressão do receptor de glicocorticóide (GR). Portanto, após a exposição a estressores, ocorrem alterações neuroquímicas no cérebro do *zebrafish*, sendo que diversos sistemas de neurotransmissão podem ser afetados pelo estresse, como o sistema glutamatérgico, purinérgico e colinérgico (Valadas et al., 2012; Piatto et al., 2011a,b; Horvat et al., 2010; Aisa et al., 2009).

#### *1.4. SISTEMA PURINÉRGICO*

No sistema purinérgico, o ATP e seus metabólitos, ADP, AMP e adenosina, produzem uma grande variedade de efeitos fisiológicos que não estão necessariamente relacionadas com o seu papel no metabolismo energético.

Drury e Szent-Györgyi, em 1929, demonstraram pela primeira vez as potentes ações extracelulares do ATP e adenosina sobre o coração e vasos sanguíneos coronários (Drury & Szent-Györgyi, 1929). A hipótese da sinalização purinérgica, com o ATP como molécula responsável pela transmissão não-adrenérgica e não-colinérgica no músculo liso do intestino e da bexiga foi proposta por Burnstock em 1972 (Burnstock, 1972).

Quando proposto, o termo "purinérgico" causou uma considerável resistência por muitos anos. Em parte porque para os bioquímicos o ATP foi estabelecido como uma fonte de energia intracelular e parecia improvável que uma molécula tão onipresente estivesse envolvida na sinalização extracelular (Burnstock, 2006).

Os nucleosídeos e nucleotídeos derivados de purinas atuam como moléculas sinalizadoras extracelulares em vários tecidos e estão envolvidos em eventos de curta e longa duração, incluindo respostas imunes, inflamação, dor, agregação plaquetária, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e morte celular (Abbracchio & Burnstock, 1998; Burnstock & Verkhatsky, 2010). A sinalização purinérgica está envolvida na patofisiologia do SNC, como trauma, epilepsia, doenças neurodegenerativas, desordens neuropsiquiátricas e do humor e câncer (Burnstock, 2012). A transmissão de sinais via ATP desempenha papéis complexos, tais como a neurotransmissão excitatória ou inibitória, além de atuar como um fator trófico com efeitos em longo prazo sobre a proliferação celular, crescimento e desenvolvimento, em situações patológicas e citotoxicidade (Abbracchio & Burnstock, 1998). O ATP pode ser liberado nos terminais pré- e pós-sinápticos. Esta liberação pode ocorrer



tanto como um mecanismo fisiológico ou em resposta a danos celulares, como hipóxia, injúrias e deformação celular (Burnstock, 2008).

A ação dos derivados das purinas se dá por meio da ativação dos receptores purinérgicos. A base para distinguir dois tipos de purinoceptores, identificados como P1 (para adenosina) e P2 (para ATP e ADP) foi descrita por Burnstock em 1978 (Burnstock, 1978).

O ATP é reconhecido como um neurotransmissor, pois é sintetizado e armazenado em terminais sinápticos e liberado após estímulo destes terminais. Além disso, esse nucleotídeo é considerado uma molécula chave na sinalização presente no SNC, e recebe maior atenção devido ao seu papel como mensageiro durante diferentes eventos fisiológicos e patológicos (Tu & Wang, 2009). O ATP também atua como um co-transmissor sendo liberado com outros neurotransmissores clássicos na maioria dos nervos do SNP e SNC, apesar das proporções apresentarem variação entre as espécies e tecidos e em diferentes condições de desenvolvimento, processos fisiológicos e patológicos. Esse nucleotídeo é liberado juntamente com a noradrenalina, neuropeptídeo Y, acetilcolina, óxido nítrico, glutamato, dopamina e serotonina (Burnstock, 1990; Hoyle, 1996; Belai & Burnstock, 1994; Krügel et al., 2003).

O ATP exerce suas ações por meio da ativação de receptores purinérgicos do tipo P2. Este grupo de purinoceptores é subdividido em duas famílias distintas de acordo com a base do mecanismo de ação, farmacologia e clonagem molecular (Burnstock & Kennedy, 1985; 2011). A primeira família é constituída pelos receptores P2X, os quais são ionotrópicos e estão distribuídos em neurônios, células gliais e no músculo liso (Valera et al., 1994; Burnstock, 2006). Os receptores do tipo P2X estão divididos em sete membros (P2X<sub>1-7</sub>) que são ligados a canais iônicos, e quando ativados levam à abertura de um poro na membrana celular que permite a passagem dos íons Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup>. Estes receptores interagem com vários receptores ionotrópicos, incluindo receptores colinérgicos nicotínicos, receptores GABA<sub>A</sub> e

receptores NMDA. Os mecanismos para estas interações parecem ser mediados pela fosforilação destes receptores, pela ação de cinases ativadas por  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular (Burnstock, 2004, 2010; Pankratov et al., 2009; Abbracchio et al., 2009). A segunda família é constituída pelos receptores metabotrópicos P2Y, acoplados a proteína G e apresentam uma ampla distribuição nos tecidos e sistemas, tais como: vascular, nervoso e cardíaco (Abbracchio & Burnstock, 1994; Burnstock, 2010). Até o presente momento, foram descritos oito membros na família de receptores P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14) (Burnstock, 2006).

A clonagem e caracterização molecular dos receptores P2X em *zebrafish* já foram realizadas (Diaz-Hernandez et al., 2002). Kucenas e colaboradores (2003) mostraram que a subunidade P2X possui nove membros, sendo seis ortólogos a genes dos receptores P2X de mamíferos, dois parálogos e um gene que ainda precisa ser devidamente classificado (Kucenas et al., 2003). Os subtipos dos receptores P2X do *zebrafish* contêm resíduos altamente conservados, os quais são encontrados em subunidades de mamíferos.

Após ser liberado no espaço extracelular e exercer suas ações via receptores específicos, o ATP pode ser metabolizado pela ação de ecto-enzimas que fazem a conversão deste nucleotídeo até adenosina (Zimmermann, 2001; Kukulski et al., 2005; Robson et al., 2006; Fredholm, 2011). A ação da adenosina se dá por meio da ativação de receptores purinérgicos do tipo P1 acoplados a proteínas G. Estes receptores são divididos em 4 subtipos de acordo com suas características, tais como estrutura molecular, distribuição tecidual e afinidade pelo seu ligante. São eles: o receptor  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  e  $A_3$ . Os receptores  $A_1$  e  $A_3$  se ligam à família das proteínas  $G_{i/o}$ , responsáveis pela inibição da produção do segundo mensageiro AMP cíclico (AMPC). Os receptores  $A_{2A}$  e  $A_{2B}$  estimulam a produção de AMPC via ativação de proteínas  $G_s$ . A porção N-terminal do receptor está voltada para o meio extracelular e a porção C-terminal está voltada para o lado citosólico da membrana plasmática

(Daly, 1985; Fredholm et al., 2001; Fredholm, 2011). Recentemente, foi realizada a caracterização molecular e farmacológica dos receptores  $A_{2A}$  em *zebrafish* (Boehmler et al., 2009). Além disso, Capiotti et al. (2011) identificou a presença de receptores de adenosina  $A_1$  e  $A_{2A1}$  em encéfalo de *zebrafish*.

A adenosina pode inibir ou facilitar a atividade neuronal pela ativação de receptores metabotrópicos  $A_1$  (inibitória) ou receptores  $A_{2A}$  (facilitatório), ambos os quais estão predominantemente localizados em sinapses no sistema límbico e neocórtex (Rebola et al., 2003, 2005; Fredholm et al. 2005). A adenosina atua em receptores  $A_1$  e pode inibir a atividade neuronal e o uso da energia por induzir uma hiperpolarização e por reduzir a liberação de neurotransmissores. Além disso, é bem estabelecido que a ativação de receptores  $A_1$  confere uma neuroproteção contra estímulos cerebrais nocivos agudos, enquanto que o bloqueio dos receptores  $A_{2A}$  proporciona uma neuroproteção em condições nocivas crônicas em cérebro adulto (Cunha et al., 2005; 2006). Por essas ações, a adenosina é capaz de proteger os neurônios que estão sob condições que desequilibram o balanço energético neuronal, os quais podem ocorrer em situações de hipóxia e excesso de atividade neuronal (Roman et al., 2008). Estudos mostraram que em condições nocivas, como durante o estresse, ocorre um aumento da concentração extracelular de adenosina no cérebro (Scaccianoce et al., 1989; Fredholm et al., 2005).

Os receptores  $A_{2A}$  são alvos modulatórios, sendo que antagonistas desses receptores podem exercer efeitos neuroprotetores contra insultos neurológicos (Mendonça et al., 2000). Além disso, o bloqueio destes receptores pode prevenir uma neurotoxicidade induzida, por exemplo, pela liberação de glutamato em resposta ao estresse (Monopoli et al., 1998; Valadas et al., 2012).

Muitos estudos têm sido realizados utilizando agonistas e antagonistas dos receptores  $P_1$ , pois a manipulação dos receptores de adenosina pode influenciar diversos processos

fisiológicos e patológicos, como o sono, cognição, memória, dano e maturação neuronal (Burnstock et al., 2011; Gao & Jacobson 2011). Além disso, existem implicações terapêuticas para doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson, Alzheimer, epilepsia e esclerose múltipla (Ribeiro et al., 2003; Burnstock, 2008). No entanto, pouco é conhecido sobre a influência dos receptores de adenosina em relação ao estresse. Nos modelos de estresse, como já foi descrito anteriormente, a ansiedade é um dos padrões que o caracterizam. Os agonistas de receptores  $A_1$  tem uma atividade ansiolítica em modelos de ansiedade em ratos, enquanto que a cafeína e antagonistas seletivos de receptores  $A_1$  têm propriedades ansiogênicas (Florio et al., 1998). Johansson et al. (2001) confirmaram o envolvimento dos receptores de adenosina  $A_1$  na ansiedade pelo achado de que ratos *knockout* para esse receptor apresentaram um aumento no comportamento de ansiedade. Dessa forma, drogas que facilitem as ações mediadas pelos receptores  $A_1$  podem estar envolvidas no tratamento da ansiedade (Ribeiro et al., 2002).

Evidências demonstram que os receptores de adenosina estão envolvidos com estados de ansiedade e ativação autonômica (Fredholm et al., 1995; 1999). De forma geral, os receptores  $A_1$  modulam a ansiedade, enquanto que receptores  $A_{2A}$  modulam o comportamento motor e regulam a atividade dos receptores  $A_1$ . Maximino et al. (2011) demonstraram que o bloqueio dos receptores de adenosina  $A_1$ , mas não dos receptores  $A_2$ , induz ansiedade e ativação autonômica, enquanto que o bloqueio de receptores  $A_2$  induz hiperlocomoção. Khor et al. (2012) mostraram que a exposição ao estresse durante o início da vida leva a um comportamento do tipo ansioso em *zebrafish* adulto, mas o pré-tratamento com cafeína (em determinadas doses) protege da ansiedade induzida por estresse. Esse efeito neuroprotetor pode ser devido à cafeína atuar como um antagonista do receptor de adenosina  $A_{2A}$  (Arendash et al., 2010; Dall'igna et al., 2003).

Diversos compostos são utilizados como agonistas e antagonistas adenosinérgicos, conforme demonstrado na Tabela 1.

**Tabela 1. Agonistas e antagonistas de receptores adenosinérgicos**

<b>Receptor adenosinérgico</b>	<b>Agonistas</b>	<b>Antagonistas</b>
A <sub>1</sub>	CPA, CHA, CCPA, S-ENBA, GR79236, CVT-510	DPCPX, CPT, MRS1754, N-0840, WRC-0571
A <sub>2A</sub>	CGS21680, NECA, CGS 21680, HENECA, ATL-146e, CVT-3146	ZM 241385, SCH58261, KF17837, KW-6002
A <sub>2B</sub>	Bay60-6583, MRS3997	MRS1754, MRS170, PSB1115, Enprofylline, MRS2029-F20
A <sub>3</sub>	2-CI-IB-MECA, IB-MECA, DBXRM, VT160	MRS1220, VUF5574, MRS1523, MRS119, L-268605, VUF8504

Adaptada de Fredholm et al., 2011; Burnstock, 2008.

### 1.5 ECTONUCLEOTIDASES

Os nucleotídeos extracelulares podem ser hidrolisados por uma variedade de enzimas solúveis ou localizadas na superfície da célula, possuindo seu sítio ativo voltado para o meio extracelular denominadas ectonucleotidases (Zimmermann et al., 1998). Diversas enzimas compõem o grupo das ectonucleotidases, constituído por quatro famílias de enzimas: Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDases), Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPPs), fosfatases alcalinas e Ecto-5'-nucleotidases (E-5'NT) (Robson et al., 2006; Abbracchio et al. 2009). Desta forma, as ectonucleotidases controlam a disponibilidade de ligantes (ATP, ADP, AMP e adenosina) para os purinoreceptores e, conseqüentemente, a extensão e a duração da ativação destes receptores (Chen & Guidotti, 2001).

As E-NTPDases podem hidrolisar nucleosídeos 5'-trifosfatados e nucleosídeos 5'-difosfatados com ampla preferência, distribuição em diferentes tecidos e localização celular (Robson et al., 2006; Bonan, 2012). A família das NTPDases possuem oito diferentes membros (NTPDases 1-8) que foram clonados e são funcionalmente caracterizados. Os membros da família das NTPDases são codificados por oito genes diferentes, chamados de genes *ENTP* (Robson et al., 2006; Knowles, 2011). Dos oito membros descritos até o momento, quatro estão localizados na membrana celular com o sítio ativo voltado para o meio extracelular (NTPDases 1, 2, 3 e 8) (Ivanenkov et al., 2005; Bonan, 2012). As NTPDases 5 e 6 se localizam intracelularmente, porém são secretadas após expressão heteróloga. As NTPDases 4 e 7 apresentam localização intracelular com o sítio ativo voltado para o lúmen de organelas citoplasmáticas (Zimmermann, 2000; Robson et al., 2006). Os membros desta família diferem em relação à preferência pelo substrato; neste caso, nucleosídeos 5'-tri e difosfatados.

As Ecto-5'-NT são uma família de enzimas que desfosforilam nucleosídeos monofosfatados não cíclicos, por meio da hidrólise da ligação fosfodiéster de 5'-ribonucleotídeos, levando à formação do correspondente ribonucleosídeo e fosfato. A principal função em animais é a hidrólise de AMP até adenosina (Yegutkin, 2008; Bonan, 2012). As Ecto-5'-NT apresentam uma ampla distribuição tecidual e fazem parte da cascata para finalizar a ação de nucleotídeos como ATP e moléculas sinalizadoras que agem em receptores P2X e P2Y, sendo a principal enzima responsável pela formação extracelular de adenosina (Zimmermann, 2000).

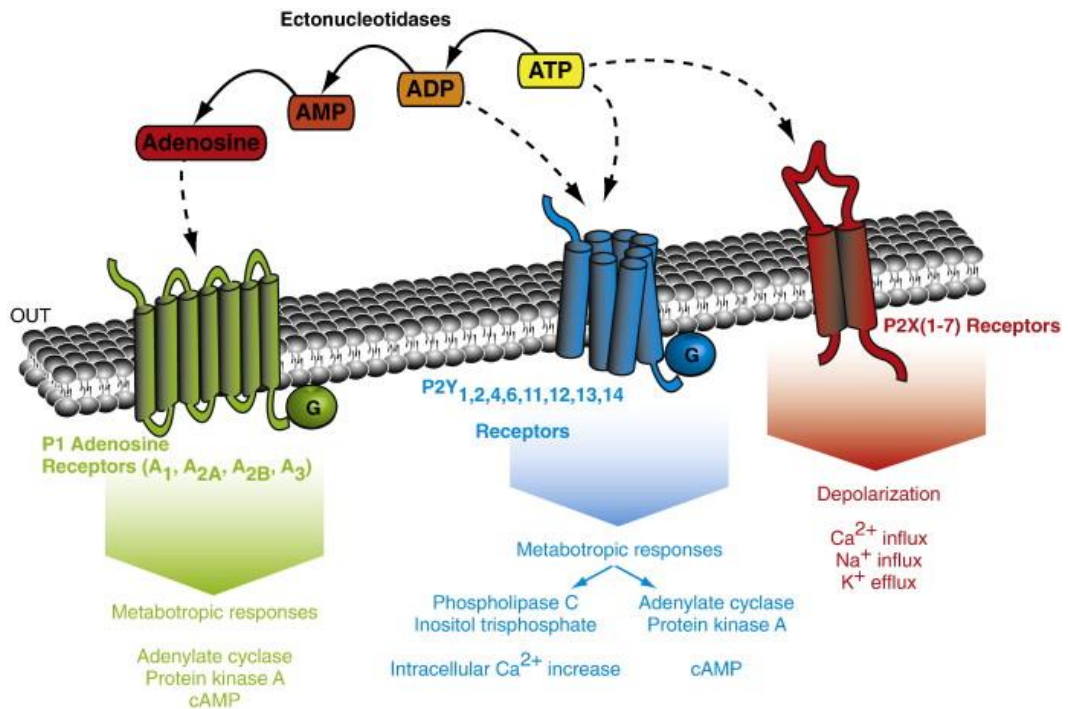


Figura 2: Família de receptores purinérgicos. ATP extracelular é um agonista de receptores P2X e P2Y e um substrato das ectonucleotidases, que degradam ATP a adenosina, gerando transitoriamente ADP, um agonista de receptores P2Y. Adenosina, o produto final da hidrólise de nucleotídeos de adenina, ativa receptores P1 ou receptores de adenosina. Figura obtida de Baroja-Mazo et al., 2013.

No *zebrafish*, estudos demonstraram a presença de uma NTPDase e uma Ecto-5'-NT em membranas cerebrais. 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). Estudos do nosso laboratório identificaram a presença de três isoformas diferentes de NTPDase 2 (NTPDase2mv, NTPDase2mg, NTPDase2mq) em encéfalo de *zebrafish* (Rico et al., 2006). A co-localização da NTPDases 1 e 2 já foi descrita em células de retina de *zebrafish* (Ricatti et al., 2009) e a NTPDase 3 foi caracterizada em neurônios sensoriais desta espécie (Appelbaum et al., 2007). A NTPDase4, duas isoformas da NTPDase5,

sendo NTPDase5\_ms e NTPDase5\_me, NTPDase6 e NTPDase8 também já foram identificadas nesta espécie (Rosemberg et al., 2010). A hidrólise dos nucleotídeos em *zebrafish* adultos aumenta em função da concentração de proteína e a formação de produto mostra-se linear na taxa de 3-10 µg de proteína para cérebro e fígado e, de 3-5 µg de proteína para coração. O perfil da expressão gênica foi realizado, demonstrando a presença de diferentes níveis de transcritos das NTPDases em cérebro, coração e fígado desta espécie (Rosemberg et al., 2010).

Horvat e colaboradores examinaram o efeito do estresse agudo por contenção em sinaptossoma cerebral de ratos e a atividade ecto-nucleotidásica em fases específicas do desenvolvimento pós-natal e observaram que há diferenças na resposta do sistema purinérgico ao estresse agudo entre ratos jovens e adultos (Horvat et al., 2010).

Burnstock (2012) relata que parece haver um aumento de ATP na co-transmissão em condições patológicas, particularmente durante a inflamação e estresse.

Alguns estudos relatam que após a exposição a estressores ocorrem alterações nas concentrações de ATP extracelular (Kennedy et al., 1997) e adenosina (Latini & Pedata, 2001). Alterações nas atividades de enzimas envolvidas na hidrólise dos nucleotídeos também foram relatadas na medula espinhal e no soro após o estresse por contenção (Torres et al., 2002a,b,c). Piato e colaboradores (2011b) avaliaram os efeitos do estresse agudo por contenção sobre parâmetros comportamentais, bioquímicos e moleculares em cérebro de *zebrafish* e observaram que o estresse agudo aumentou significativamente a hidrólise de ATP e a expressão do gene membro da NTPDase (*entpd1*, *entpd2* e *entpd2.a1*). Além disso, a avaliação dos receptores de adenosina no cérebro de *zebrafish* demonstrou que os níveis de RNAm de *adora1*, *adora2a.1*, *adora2a.2* e *adora2b* aumentaram significativamente (Piato et al., 2011b). No entanto, apesar do conhecimento das respostas de estresse em mamíferos, os dados sobre a relação entre o estresse crônico imprevisível e seus efeitos sobre o sistema



purinérgico são limitadas. Além disso, a resposta crônica ao estresse em *zebrafish* ainda é pouco conhecida.

### 1.6 ADENOSINA DEAMINASE

O controle da sinalização adenosinérgica pode ser exercido pela captação de adenosina via transportadores bidirecionais, seguida pela fosforilação de AMP intracelular pela adenosina quinase (AK) ou deaminação pela adenosina deaminase (ADA) (Fredholm et al., 2005).

O nível intracelular é regulado pelo equilíbrio de diversas enzimas. A adenosina é formada pela ação de uma 5'-nucleotidase seletiva para AMP, sendo que esta via é controlada principalmente pela quantidade de AMP. Portanto, um fator importante para determinar a taxa de formação de adenosina através deste caminho é a taxa relativa de quebra de ATP e síntese de adenosina (Fredholm & Lerner, 1982). Estas são determinadas, por sua vez, pela taxa de utilização da energia e da disponibilidade de substrato, principalmente o oxigênio, usado na síntese de ATP. A adenosina quinase e adenosina desaminase são as duas enzimas que constituem as principais vias de eliminação da adenosina. A última enzima está presente predominantemente no meio intracelular, mas também é encontrada em alguns compartimentos extracelulares (Fredholm & Lerner, 1982; Fredholm et al., 2007).

Dessa forma, a adenosina deaminase (ADA) é uma enzima envolvida no metabolismo de purinas, responsável pela desaminação hidrolítica de adenosina à inosina e amônia. Como resultado de sua atividade enzimática, a ecto-ADA regula a concentração de adenosina na fenda sináptica (Martinez-Navio et al., 2010). Existem diferentes membros de ADA que

incluem ADA1, ADA2, e uma sequência de aminoácidos similar, chamada de adenosina deaminase-like (ADAL) (Maier et al., 2005).

Em relação aos diferentes membros de proteínas relacionados à ADA, tem sido demonstrado que quase todas as atividades da ADA em humanos são atribuídas a ADA1 (Zavialov & Engstrom, 2005). Apesar da sua localização intracelular, ADA1 também atua como uma ecto-ADA, clivando adenosina extracelular (Franco et al., 1997).

Rosemberg e colaboradores (2007) demonstraram a existência de diferentes genes relacionados à adenosina deaminase, com um padrão de expressão ubíquo em *zebrafish*. Além disso, outro trabalho descreveu a cinética enzimática e propriedades da desaminação de adenosina a partir do cérebro de *zebrafish* e a presença de atividade da ADA nas membranas cerebrais sugerindo a existência de uma ecto-ADA em *zebrafish* (Rosemberg et al., 2008). Assim, sugeriu-se que a desaminação da adenosina no SNC de *zebrafish* promovida por diferentes membros da família da ADA pode ser um elemento-chave para o controle da adenosina/inosina no meio intracelular e extracelular (Rosemberg et al., 2008).

Conforme observado por Piatto et al. (2011b), o estresse agudo por contenção diminuiu a atividade da ADA citosólica e alterou a expressão dos receptores de adenosina, já que aumentou os níveis de RNAm de *adora<sub>1</sub>*, *adora<sub>2a.1</sub>*, *adora<sub>2a.2</sub>* e *adora<sub>2b</sub>*. Essa alteração na sinalização da adenosina pode ser parte das respostas do estresse como uma tentativa de reestabelecer a homeostase e o comportamento normal após um evento estressante.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel do sistema purinérgico, por meio da análise das atividades ectonucleotidásicas e adenosina deaminase e os efeitos de agonistas e antagonistas de receptores de adenosina, em *zebrafish* submetidos a um modelo de estresse crônico imprevisível.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade da hidrólise de ATP, ADP e AMP em membranas de encéfalo de *zebrafish* submetidos a um modelo de estresse crônico imprevisível;
- Determinar a atividade enzimática da ADA em membranas de encéfalo de *zebrafish* submetidos a um modelo de estresse crônico imprevisível;
- Determinar a expressão gênica das E-NTPDases, ecto-5'-nucleotidase e ADA em SNC de *zebrafish* submetidos ao modelo de estresse crônico imprevisível, por RT-PCR quantitativo;
- Analisar o metabolismo do ATP em encéfalo de *zebrafish* submetidos ao modelo de estresse crônico imprevisível, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- Investigar os efeitos do agonista adenosinérgico de receptores A<sub>1</sub> (CPA) e do antagonista adenosinérgico de receptores A<sub>2A</sub> (ZM) sobre a atividade locomotora e ansiedade em *zebrafish* submetidos a um modelo de estresse crônico imprevisível.

## **CAPÍTULO 2**

### **ARTIGO CIENTÍFICO**

**Effect of unpredictable chronic stress on nucleotide and nucleoside metabolism in zebrafish (*Danio rerio*) brain.** Fernanda Francine Zimmermann; Stefani Altenhofen; Luisa Wilges Kist; Carlos Eduardo Leite; Maurício Reis Bogo; Giana de Paula Cognato; Carla Denise Bonan

Artigo submetido em 12 de Janeiro de 2013 ao periódico *Neurochemistry International*.

De: [ees.nci.0.1e8631.d7eb2963@eesmail.elsevier.com](mailto:ees.nci.0.1e8631.d7eb2963@eesmail.elsevier.com) [[ees.nci.0.1e8631.d7eb2963@eesmail.elsevier.com](mailto:ees.nci.0.1e8631.d7eb2963@eesmail.elsevier.com)] em nome de Neurochemistry International [[nci@elsevier.com](mailto:nci@elsevier.com)]

Enviado: sábado, 12 de janeiro de 2013 16:17

Para: Carla Denise Bonan

Assunto: Submission Confirmation

Neurochemistry International

Title: Effect of unpredictable chronic stress on nucleotide and nucleoside metabolism in zebrafish (*Danio rerio*) brain

Authors: Fernanda F Zimmermann; Stefani Altenhofen; Luisa W Kist; Carlos E Leite; Mauricio R Bogo; Giana P Cognato; Carla Denise Bonan, Ph.D.

Article Type: Research Article

Dear Dr. Bonan,

Your submission entitled "Effect of unpredictable chronic stress on nucleotide and nucleoside metabolism in zebrafish (*Danio rerio*) brain" has been received by Neurochemistry International.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/nci/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal. Please do not hesitate to contact me if you have any queries.

Kind regards,

Neurochemistry International

\*\*\*\*\*

**Effect of unpredictable chronic stress on nucleotide and nucleoside metabolism in  
*zebrafish (Danio rerio) brain***

Fernanda Francine Zimmermann <sup>a</sup>; Stefani Altenhofen <sup>a</sup>; Luisa Wilges Kist <sup>b</sup>; Carlos Eduardo Leite <sup>d</sup>; Maurício Reis Bogo <sup>b,c</sup>; Giana de Paula Cognato <sup>a</sup>; Carla Denise Bonan <sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>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

<sup>b</sup>Laboratório de Biologia Celular e Molecular, 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

<sup>c</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM), 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>d</sup>Instituto de Toxicologia e Farmacologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, CEP 90619-900, Brazil.

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

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

## **Abbreviations**

adrenocorticotrophic hormone, ACTH; acute restraint stress, ARS; corticotrophin releasing hormone, CRH; hypothalamic–pituitary–interregnal axis, HPI; unpredictable chronic stress, UCS.

## **Highlights**

- Brain ATP metabolism showed an increase in adenosine levels after UCS exposure.
- There are no changes on ADA gene expression after the UCS exposure.
- Soluble ADA activity was not altered after the UCS exposure.
- Ecto-ADA activity was significantly decreased in brain membranes of animals.
- There are no changes on ectonucleotidase in *zebrafish* brain after UCS exposure.

## **Abstract**

Stress has become an integral part of human life and organisms are being constantly submitted to stressful stimuli that alter numerous physiological processes. Despite the broad knowledge of stress responses in mammals, data on the relationship between unpredictable chronic stress (UCS) and its effects on purinergic signaling are limited. The ATP hydrolysis by ectonucleotidases is an important source of adenosine and adenosine deaminase (ADA) contributes to the regulation of the nucleoside concentrations through its deamination. Considering that some stress models can affect signaling systems, the objective of this study was to investigate whether UCS alters ectonucleotidases and ADA pathway in *zebrafish* brain. Additionally, we analyzed ATP metabolism as well as *ada1*, *ada2.1*, *ada2.2*, *adaL*, and *adaasi* gene expression in *zebrafish* brain. Our results have demonstrated that UCS did not alter ectonucleotidase and soluble ADA activities. However, ecto-ADA activity was significantly decreased (26.8%) in brain membranes of animals exposed to UCS when compared to the control group. Quantitative RT-PCR analysis did not show significant changes on ADA gene expression after the UCS exposure. The brain ATP metabolism showed a marked increase in adenosine levels (ADO) in animals exposed to UCS. These data suggest an increase on extracellular adenosine levels in *zebrafish* brain. Since this nucleoside has neuromodulatory and anxiolytic effects, changes in adenosine levels could play a role in counteracting the stress, which could be related to a compensatory mechanism in order to restore the homeostasis.

## **Keywords:**

Adenosine; Adenosine deaminase; Ectonucleotidases; Unpredictable chronic stress; *Zebrafish*.



## 1. Introduction

Stress has become an integral part of human life and organisms are constantly submitted to stressful stimuli that affect numerous physiological processes (Bhatia et al., 2011). Stress mobilizes a complex spectrum of adaptive physiological and behavioral responses that aim to re-establish the challenged body homeostasis (Kyrou and Tsigos, 2009). The short-term period stress response is beneficial to an organism, because energy stores are mobilized and redistributed to cope with the stressor (Löhr and Hammerschmidt, 2011). However, chronic or repeated stress has been shown to affect physiological (Hirsch and Zukowska, 2012) immunological (Swaab et al., 2005), endocrine (Lemaire et al., 2006), and developmental processes (Canu et al., 2007) as well as induce depressive-like behaviors (Harvey et al., 2008). In mammals, the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and the sympathetic nervous system (SNS) constitute the main effector pathways of the stress system, mediating its adaptive functions (Kyrou and Tsigos, 2009).

*Zebrafish* is emerging as a promising model for experimental studies of stress and anxiety (Egan et al., 2009) and is useful for studying behavioral and molecular mechanisms of brain disorders (Maximino et al., 2010; Rico et al., 2011), developmental biology, disease processes, and neurodegeneration (Fleming and Rubinsztein, 2011; Ingham, 2009). Analogues of the HPA axis have been found in *zebrafish*, corresponding to the hypothalamic–pituitary–interregal (HPI) axis, which controls the levels of circulating cortisol, involved in restoring homeostasis that is disrupted in response to stressor exposure (Alsop and Vijayan, 2008; 2009a). The activation of the HPI axis begins at the hypothalamus, which secretes corticotrophin releasing hormone (CRH). In response to CRH, the pituitary releases adrenocorticotrophic hormone (ACTH) into the bloodstream, which reaches the head kidney of fish (Alsop and Vijayan, 2009a), leading to corticosteroid biosynthesis. The functions of

different endocrine and neurotransmitter systems were compared between *zebrafish* and other vertebrates, including humans, and major aspects are conserved (Löhr and Hammerschmidt, 2011; Rico et al., 2011) and are physiologically homologous to humans (Alsop and Vijayan, 2008; 2009a). In addition, *zebrafish*, like humans, employ cortisol (rather than corticosterone, as do rodents) as a primary stress response hormone (Barcellos et al., 2007), which makes them a useful animal model relevant to human stress physiology.

Studies have reported changes in the concentrations of extracellular ATP (Kennedy et al., 1997) and adenosine in rodents (Latini and Pedata, 2001) after exposure to stressors. However, the relationship between chronic stress and its effects on purinergic signaling in *zebrafish* are limited. Extracellular adenosine 5'-triphosphate (ATP) is a key signaling molecule present in the central nervous system (CNS) and plays a role as a messenger in the CNS during different physiological and pathological events (Tu and Wang, 2009). Extracellular nucleotides and adenosine act on two classes of purinergic receptors: P2 and P1, respectively. Adenosine mediates its action through activation of the P1 receptors, which are G protein-coupled receptors (GPCRs) while ATP activates ionotropic P2X receptors and GPCRs P2Y receptors (Burnstock, 1978; Burnstock et al., 2011).

ATP is catabolized by a cascade of enzyme families located on the cell surface called ectonucleotidases. These enzymes mediate nucleotide-mediated signaling, controlling the rate, amount, and timing of nucleotide degradation and adenosine production (Bonan, 2012; Robson et al., 2006). Tri- and diphosphonucleosides may be hydrolyzed by ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase), whereas ecto-5'-nucleotidase hydrolyzes nucleoside monophosphates producing adenosine (Bonan, 2012; Zimmermann, 2001). Adenosine levels can be controlled by adenosine deaminase (ADA), which is responsible for cleaving the neuromodulator adenosine into inosine. Two members of the ADA subfamily, ADA1 and ADA2, were described and evidence showed another similar protein group, called

ADAL (adenosine deaminase-like) (Rosemberg et al., 2007). The NTPDase, ecto-5'-nucleotidase, and ADA activities were described in *zebrafish* brain membranes and share several kinetic properties with the enzymes previously identified in mammals (Rico et al., 2003; Rosemberg et al., 2008; Senger et al., 2004). Studies have already demonstrated that acute restraint stress alters ADA activities in *zebrafish* brain (Piato et al., 2011b). Considering that adenine nucleotides and nucleoside are involved in the modulation of several physiological and pathological processes, and their levels may be altered by stress, it is important to investigate the interaction between extracellular nucleotide and nucleoside catabolism and unpredictable chronic stress. Therefore, the aim of this study was to verify whether UCS alters ectonucleotidase and ADA pathway in *zebrafish* brain. Additionally, we analyzed ATP metabolism as well as *ada1*, *ada2.1*, *ada2.2*, *adaL*, and *adaasi* gene expression in *zebrafish* brain.

## **2. Material and methods**

### *2.1. Animals and housing*

Adult male “wild type” (short fin) *zebrafish* (*Danio rerio*) were obtained from a commercial supplier (Red Fish, Porto Alegre, Brazil). All fish were acclimated for at least two weeks in the experimental room and housed in groups of 20 fish in 15 l heated ( $28 \pm 2$  °C) tanks with constant aerated water. Fish were kept on a 14–10 h day/night cycle and fed three times a day with commercial flakes (TetraMin®) and supplemented with live brine shrimp. All protocols were approved by the Institutional Animal Care Committee (11/00249-CEUA) and followed Brazilian legislation, the guidelines of the Brazilian Collegium of Animal Experimentation

(COBEA), and the Canadian Council for Animal Care (CCAC) guide on the care and use of fish in research, teaching, and testing.

## 2.2 Chemicals

ATP, ADP, AMP, Adenosine, Trizma Base, ammonium molybdate, polyvinyl alcohol, Malachite Green, EDTA, EGTA, sodium citrate, calcium chloride were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Phenol, sodium nitroprusside, and magnesium chloride were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Trizol® Reagent, dNTPs, oligonucleotides, Taq polymerase, SYBR® Green I Low DNA Mass Ladder were purchased from Invitrogen (Carlsbad, California, USA) and ImProm-II™ Reverse Transcription System was obtained from Promega (São Paulo, SP, Brazil). Primers were obtained from Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA). All other reagents used were of analytical grade.

## 2.3 Unpredictable chronic stress protocol (UCS)

The animals were divided into two groups: stressed and control. UCS was applied according to the protocol established by Piato et al. (2011a) described below. Following a two-week habituation period, fish were submitted twice a day to one of the following stressors either during 7 days (Table 1): restraint stress, consisting of maintaining each animal for 90 min inside a small 2 ml microcentrifuge tube open in both ends to allow water flow; heating tank water up to 33 °C for 30 min; social isolation, maintaining animals alone for 45 min in a 250 ml beaker; cooling tank water up to 23 °C for 30 min; crowding of 10 animals for 50 min in a 250 ml beaker; exposition to predator (*Archocentrus nigrofasciatus* fish) in close proximity for 50 min but avoiding direct contact; low water level on housing tanks until animal's dorsal

body wall were exposed for 2 min; tank water replacement, three consecutive times with animals inside; tank change, three consecutive times; and chasing animals for 8 min with a net. Aeration and temperature were controlled during each stressor presentation (except during heating and cooling stress). To prevent habituation and maintain unpredictability, time and sequence of stressor's presentation were changed daily. A non-stressed control group remained in the same room during the equivalent 7-day period. Despite the stressful conditions intermittently presented to the fish, no extreme suffering was caused or observed.

#### *2.4 Preparation of soluble and membrane fractions*

Immediately after the UCS, control and stressed fish were cryoanaesthetized and euthanized (Wilson et al., 2009). The brains were removed by dissection and added to 60 volumes (v/w) of chilled Tris-citrate buffer (50 mM Tris citrate, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, pH 7.4, adjusted with citric acid) for NTPDase and ecto-5'-nucleotidase assays (Rico et al., 2003; Senger et al., 2004). For ADA activity experiments, brains were homogenized in 20 volumes (v/w) of chilled phosphate buffered saline (PBS), with 2 mM EDTA and 2 mM EGTA, pH 7.4 (Rosemberg et al., 2008). Each independent experiment was performed using biological preparations consisted by a “pool” of five whole brains. The preparation of brain membranes was according to a previously described method (Barnes et al., 1993). Briefly, samples were homogenized on ice in a motor-driven Teflon- glass homogenizer. The preparations were centrifuged at 800 g for 10 min at 4°C to remove the nuclei and cell debris and the supernatant fractions were subsequently centrifuged at 40.000 g for 25 min. The resultant supernatant and the pellet obtained corresponded to the cytosolic and membrane fractions, respectively. For soluble ADA activity experiments, the supernatant was collected and kept on ice for enzyme assays. The pellets of both membrane preparations were frozen in liquid nitrogen, thawed,

resuspended with the respective buffers and centrifuged at 40.000 *g* for 20 min. This freeze-thaw-wash procedure was used to ensure the lysis of the brain vesicles membranes. The final pellets were resuspended and used for the measurements of ectonucleotidase and ecto-ADA activities. All cellular fractions were maintained at 2–4°C throughout preparation and they were immediately used for enzyme assays.

### *2.5 Nucleotide Hydrolysis Assays*

Ectonucleotidase activities were determined as previously described (Rico et al., 2003; Senger et al., 2004). Brain membranes (3–5 µg protein) were added to the reaction mixture containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 5 mM CaCl<sub>2</sub> (for NTPDase activities) and 50 mM Tris-HCl (pH 7.2) and 5 mM MgCl<sub>2</sub> (for ecto-5'-nucleotidase activity) in a final volume of 200 µl. The samples were preincubated for 10 min at 37°C before starting the reaction with the addition of substrate (ATP, ADP or AMP) to a final concentration of 1 mM. The reactions were stopped after 30 min with the addition of trichloroacetic acid at a final concentration of 5% and immediately placed on ice for 10 min. The inorganic phosphate (Pi) released was determined by colorimetric assay using Malachite Green reagent (Chan et al., 1986) and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> as standard. To ensure that the concentration of Pi was within the linear range, dilutions of 1:8 and 1:2 to a volume of 400 µl were performed for the assessment of ATP and ADP hydrolysis, respectively. Samples were mixed to 1 ml of Malachite Green solution and nucleotide hydrolysis was determined spectrophotometrically at 630 nm after 20 min. Controls with the addition of the enzyme preparation after incubation period were used to correct non-enzymatic hydrolysis of substrates. Incubation times and protein concentrations were chosen to ensure the linearity of the reactions. NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities were expressed as nmol Pi min<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup>.

## 2.6 Adenosine deaminase Assay

Ecto- and cytosolic ADA activities were determined spectrophotometrically by measuring the ammonia produced over a fixed time using a Berthelot reaction as previously reported (Weisman et al., 1988). After the preparation of soluble and membrane fractions, the optimum conditions for adenosine hydrolysis were determined. The membrane and cytosolic fractions (5–10  $\mu\text{g}$  protein) were added to the reaction mixture containing 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) and 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), respectively, in a final volume of 200  $\mu\text{L}$ . The samples were preincubated for 10 min at 37 °C and the reaction was initiated by the addition of substrate adenosine to a final concentration of 1.5 mM. After incubated for 75 min (soluble fraction) and 120 min (membranes), the reaction was stopped by adding the samples on a 500  $\mu\text{L}$  of phenol-nitroprusside reagent (50.4 mg of phenol and 0.4 mg of sodium nitroprusside/mL). Controls with the addition of the enzyme preparation after mixing with phenol-nitroprusside reagent were used to correct non-enzymatic hydrolysis of substrates. The reaction mixtures were immediately mixed to 500  $\mu\text{L}$  of alkaline-hypochlorite reagent (sodium hypochlorite to 0.125% available chlorine, in 0.6MNaOH) and vortexed. Samples were incubated at 37 °C for 15 min and the colorimetric assay was carried out at 635 nm. Incubation times and protein concentrations were chosen in order to ensure the linearity of the reactions. Both ecto- and cytosolic ADA activities were expressed as  $\text{nmol NH}_3 \text{ min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ .

## 2.7 Gene expression analysis by quantitative real time RT-PCR (RT-qPCR)

Analysis of the *ada1*, *ada2.1*, *ada2.2*, *adaL*, and *adaasi* gene expression was performed by a quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) assay. RT-qPCR was performed on a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with SYBR green fluorescent label. The *ada1*, *ada2.1*, *ada2.2*, *adaL*, and *adaasi* primers were designed using the Oligos 9.6 program. The *EF1 $\alpha$* , *Rpl13 $\alpha$*  and  $\beta$ -actin primers were used as constitutive genes for data analysis, as described previously (Tang et al., 2007) (Table 2). Gene expression analysis was carried out only when kinetic alteration occurred. Immediately after the UCS, groups of animals (control and stressed fish) were euthanized and the brains were removed for total RNA extraction with Trizol<sup>®</sup> Reagent in accordance with the manufacturer's instructions. Four independent assays for each tested group were performed and a pool of five whole *zebrafish* brains was used for each independent experiment. Total RNA was isolated with Trizol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. The total RNA was quantified by spectrophotometry and the cDNA was synthesized with ImProm-II<sup>™</sup> Reverse Transcription System (Promega) from 1  $\mu$ g of total RNA, following the manufacturer's instructions. Quantitative PCR was performed using SYBR<sup>®</sup> Green I (Invitrogen) to detect double-strand cDNA synthesis. Reactions were done in a volume of 25  $\mu$ L using 12.5  $\mu$ L of diluted cDNA (1:50 for *EF1 $\alpha$* , *Rpl13 $\alpha$* ,  $\beta$ -actin, *ada1*, *ada2.1*, *adaL*, *adaasi*, and 1:20 *ada2.2*), containing a final concentration of 0.2 x SYBR<sup>®</sup> Green I (Invitrogen), 100  $\mu$ M dNTP, 1 x PCR Buffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 U Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase (Invitrogen) and 200 nM of each reverse and forward primers (Table 2). Samples were run in quadruplicate in optically clear 96-well plates (Applied Biosystems). For each qPCR set, a negative control was included. The PCR cycling conditions were: an initial polymerase activation step for 5 min at 95°C, 40 cycles of 15 s at



95°C for denaturation, 35 s at 60 °C for annealing and 15 s at 72°C for elongation. At the end of cycling protocol, a melting-curve analysis was included and fluorescence measured from 60 to 99 °C. Relative expression levels were determined with 7500 Real-Time Software v.2.0.5 (Applied Biosystems). The efficiency per sample was calculated using LinRegPCR 11.0 Software (<http://LinRegPCR.nl>) and the stability of the references genes, *EF1α*, *Rpl13α* and *β-actin* (*M-value*) and the optimal number of reference genes according to the pairwise variation (*V*) were analyzed by GeNorm 3.5 Software (<http://medgen.ugent.be/genorm/>). Relative RNA expression levels were determined using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method.

### *2.8 Analysis of ATP metabolism by high performance liquid chromatography (HPLC) in zebrafish brain*

Membrane samples were obtained as described in the subsection 2.4. The reaction medium contained 50 mM Tris–HCl (pH 8.0) and 5 mM CaCl<sub>2</sub> (for NTPDase activities) in a final volume of 200 µl. The membrane preparation (3-5 µg protein) was added to the reaction mixture and preincubated for 10 min at 37 °C. To start the reaction, ATP was added to the medium in a final concentration of 0.1 mM at 37 °C. Aliquots of the sample were collected at different incubation times (0–180 min), with the reaction being stopped on ice. All samples were centrifuged 14.000 g for 15 min. An HPLC system equipped with an isocratic pump, a diode array detector (DAD), a degasser, and a manual injection system was used (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Aliquots of 20 µl were applied into HPLC system and chromatographic separations were performed using a reverse-phase column (150 mm x 4 mm, 5 µm Agilent® 100 RP-18 ec). The flow rate of the 60 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM tetrabutylammonium chloride, pH 6.0, in 13% methanol mobile phase was 1.2 mL/min. The absorbance was monitored at 260 nm, according to a method previously described, with few

modifications (Voelter et al., 1980). The peaks of purines (ATP, ADP, AMP, adenosine, and inosine) were identified by their retention times and quantified by comparison with standards. The results are expressed as  $\mu\text{mol}$  of the different compounds for each different incubation time. All incubations were carried out in triplicate and the controls to correct nonenzymatic hydrolysis of nucleotides were performed by measuring the peaks present into the same reaction medium without membrane. The control for intrinsic membrane purines was performed by incubation of the preparation without the substrate under the same conditions.

### 2.9 Statistical analysis

For enzyme assays, the data are shown as mean  $\pm$  S.D of five experiments. For molecular and HPLC analysis, the results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M of four experiments. Statistical analysis was performed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Tukey multiple range test. Statistically significant differences between groups were considered for a  $P < 0.05$ . All data were evaluated by GraphPad Prism 5 for Windows.

## 3. Results

In this study, we verified the effects of UCS protocol on ectonucleotidases (NTPDase and ecto-5'-nucleotidase) and ADA activities, which are responsible for regulating the extracellular concentrations of purine and pyrimidine nucleotides.

Our results have demonstrated no changes on ATP, ADP, and AMP hydrolysis in brain membranes of *zebrafish* submitted to UCS (Table 3). In contrast, ecto-ADA activity was significantly decreased (26.8%;  $8.164 \pm 0.78 \text{ NH}_3 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  of protein;  $P < 0.05$ ;  $n=5$ ) in brain membranes of animals exposed to UCS when compared to the control group ( $11.15 \pm$

2.16  $\text{NH}_3 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  of protein;  $P < 0.05$ ;  $n = 5$ ) (Fig. 1A, B). However, the soluble ADA activity was not altered after the UCS protocol (Fig. 1A, B).

Since we have observed significant changes on ADA activity, we investigated whether UCS has any effect in the expression of ADA genes. Quantitative RT-qPCR analysis did not show significant changes on *ada1*, *ada2.1*, *ada2.2*, *adaL*, *adaasi* gene expression after the UCS exposure ( $n = 4$ ; Fig. 2).

Measurements of nucleotide and nucleoside levels can constitute an important contribution to the knowledge of the role of purines in stress. The ATP metabolism in the brain membrane preparations from control and stressed group was measured by HPLC and is presented in Fig.3. The results showed a marked increase in adenosine levels (ADO), such as 1.32 and 1.17 times higher (from 5 and 180 min of incubation) in animals exposed to UCS when compared to the control group (Fig 3D). We also have observed that the enhancement in adenosine levels was not accompanied by change in ATP, ADP, AMP and inosine levels in animals exposed to UCS when compared to control group (Fig. 3A, B, C, and E).

#### 4. Discussion

The findings of the present study have demonstrated that brain ecto-ADA activity was altered in *zebrafish* submitted to UCS protocol. Soluble ADA, NTPDase, and 5'-nucleotidase activities have not shown significant changes after UCS. However, the analysis of nucleotide and nucleoside metabolism showed a marked increase in adenosine levels in brain membranes of animals exposed to UCS when compared to the control group.

Piato et al (2011a) showed that UCS protocol increased the anxiety levels, impaired cognitive function, increased CRH while decreased GR expression and increased cortisol levels in *zebrafish*. After cortisol is released to the circulation, it could be metabolized to

cortisone (Alsop and Vijayan, 2009b), a known glucocorticoid, which were found to have an important neuromodulatory role in the regulation of neuronal function in the brain (Abrahámet al., 2000). Recent studies have demonstrated that corticosteroid hormones interact with various neurotransmitter systems, including purinergic system, in which the expression of adenosine A<sub>1</sub> receptors is modified in presence of high levels of glucocorticoids (Ren and Stiles, 1999). In addition, several studies have demonstrated the existence of different stress effects on ATP, ADP, and AMP hydrolysis depending on synaptosomal source and stress duration (Fontella et al., 2004; Horvat et al., 2010; Souza et al., 2011). In brain synaptosomes (frontal cortex and hypothalamus), there were no changes on ATP or ADP hydrolysis after chronic stress (Torres et al., 2002). Meanwhile, the same stress protocol was able to induce an increase on ATP hydrolysis, without changes in the ADP or AMP hydrolysis in rat hippocampal synaptosomes (Fontella et al., 2004). In our study, no effect was observed on the ectonucleotidases (NTPDase and ecto-5'-nucleotidase) after the exposure to UCS protocol in *zebrafish* brain. Such findings could indicate that there is an adaptive response in order to maintain nucleotide levels in chronic stress, since this condition did not alter significantly the ectonucleotidase activities.

The hypothesis of enzyme adaptive response after chronic stress is reinforced by the previous evidence that ectonucleotidase activities are modulated after induction of acute stress. Horvat et al. (2010) examined the effect of acute restraint stress on rat brain synaptosomal ectonucleotidase activities at specific stages of postnatal development (15-,30-,60- and 90-day-old rats) by measuring the rates of ATP, ADP, and AMP hydrolysis at 1, 24, and 72 h post-stress. The authors observed the developmental dependence of brain ectonucleotidase susceptibility to acute stress and the possible existence of different mechanisms involved in time-dependent modulation of ectonucleotidase activities following stress exposure. Souza et al. (2011) investigated the influence of acute stress exposure upon

temporal patterns of NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rat blood serum and verified a time-dependent decrease in nucleotidase activities, persisting for at least 24 hours. Fontella et al. (2004) observed an increased ATP, ADP, and AMP hydrolysis in rat hippocampal synaptosomes induced by acute stress. Piato et al. (2011b) showed that *zebrafish* submitted to a 90 min of acute restraint stress (ARS) significantly increased ATP hydrolysis. Glucocorticoids have already been reported to alter the activity of other enzymes involved in the hydrolysis of ATP. High levels of glucocorticoids or exposure to acute stress have been reported to increase Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in brain and other tissues (Rodrigo et al., 2002; Shaheen et al., 1996), while decreasing Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity (Bhargava et al., 2000, 2002), although other nonglucocorticoid-dependent factors appear also to be involved in the response of these enzymes to stress (Bhargava et al., 2000). Torres et al. (2001) mentioned that chronically stressed animals do not experience all the hormonal consequences that animals exposed to one single-stress episode do and this phenomenon of adaptation to chronic stress may be reflected in several biochemical and physiological processes (Hashiguchi et al., 1997). Therefore, the differences observed on ectonucleotidase activities after acute restraint stress and UCS suggests an adaptation of purinergic system to these conditions in *zebrafish* brain.

Adenosine deamination is an important mechanism able to promote tissue homeostasis and adenosine signaling in brain (Franco et al., 1997; Sun et al., 2005). In the present study, we demonstrated that UCS decreased ecto-ADA activity in the *zebrafish* brain. RT-qPCR results showed that UCS did not interfere in the expression of ADA-related genes, indicating that chronic stress did not modulate the mRNA synthesis of enzymes able to deaminate adenosine. Therefore, it is possible to suggest that the significant decrease in adenosine deamination promoted by UCS is not due to changes in the transcriptional control. The evaluation of purine metabolism performed by HPLC corroborates this hypothesis, since we observed that adenosine levels were markedly increased on stressed group when compared to

control group. The increase in adenosine levels is in agreement with the data obtained for ecto-ADA activity.

Adenosine has several functions within the CNS, including the inhibitory tone of neurotransmission and neuroprotective actions in pathological conditions (de Mendonça et al., 2000). In the brain, adenosine released under stress conditions counteracts the release and damaging effects of excitatory neurotransmitters, such as glutamate, by activation of the adenosine A<sub>1</sub> receptors, which reduces neurotransmitter release and depresses the neuronal activity in the CNS (Jacobson and Gao, 2006). Glutamate is the most widespread excitatory neurotransmitter and may be potently toxic, when present in high concentrations in the synaptic cleft (Tzingounis and Wadiche, 2007), and it has been shown that this excitotoxic effect is involved in various neurological disorders (Maragakis and Rothstein, 2004; Struzynska, 2009). Magarinos et al. (1997) suggests that chronic restraint stress increases the release of glutamate. The neuroprotective effects of adenosine may prevent a possible neurotoxicity induced by stress, specially associated to activation of adenosine A<sub>1</sub> receptors (de Mendonça et al., 2000). Therefore, the decreased ecto-ADA activity observed in our results leads to an increase on extracellular adenosine levels. These findings support the hypothesis that the modulatory effect on ecto-ADA could be related to a compensatory mechanism in order to reestablish the homeostasis and a change in the adenosine pool, which can influence the neuroprotective effects produced by this nucleoside in *zebrafish* brain.

In conclusion, this study demonstrated that UCS inhibited the ecto-ADA activity, an important enzyme in purinergic metabolism, leading to altered brain adenosine/inosine levels in *zebrafish* submitted to UCS. The observed change in adenosine levels could induce a physiological response able to protect from damage caused by exposure to stressors. In addition, our findings indicate differences between extracellular nucleotide and nucleoside metabolism after UCS and the previously reported acute stress exposure in *zebrafish*.

## Disclosure

The authors declare no conflicts of interest.

## Acknowledgments

This study was supported by DECIT/SCTIE-MS through Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (Proc. 10/0036-5, conv. n. 700545/2008 – PRONEX) and by FINEP research grant “Implantação, Modernização e Qualificação de Estrutura de Pesquisa da PUCRS” (PUCRSINFRA) # 01.11.0014-00.

F.F.Z. was recipient of fellowship from CAPES. G.P.G. and C.D.B were recipients of fellowships from CNPq.

## References

- Abrahám, I., Harkany, T., Horvath, K.M., Veenema, A.H., Penke, B., Nyakas, C., Luiten, P.G., 2000. Chronic corticosterone administration dose-dependently modulates Abeta (1-42) - and NMDA induced neurodegeneration in rat magnocellular nucleus basalis. *J. Neuroendocrinol.* 12, 486-494.
- Alsop, D., Vijayan, M.M., 2008. Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in *zebrafish*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294:R711-9.
- Alsop, D., Vijayan, M., 2009a. The *zebrafish* stress axis: molecular fallout from the teleost specific genome duplication event. *Gen. Comp. Endocrinol.* 161, 62-6.
- Alsop, D., Vijayan, M.M., 2009b. Molecular programming of the corticosteroid stress axis during *zebrafish* development. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 153, 49-54.

- Barcellos, L.J.G., Ritter, F., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., da Silva, L.B., Bedin, A.C., Finco, J., Cericato, L., 2007. Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with a predator in *zebrafish*, *Danio rerio*. *Aquaculture* 272, 774-78.
- Barnes, J.M., Murphy, P.A., Kirkham, D., 1993. Interaction of guanine nucleotides with [3H]kainate and 6-[3H]cyano-7-nitroquinoxaline- 2, 3-dione binding in goldfish brain. *J. Neurochem.* 61,1685-1691.
- Bhargava, A., Mathias, R.S., McCormick, J.A., Dallman, M.F., Pearce, D., 2002. Glucocorticoids prolong Ca(2+) transients in hippocampal-derived H19-7 neurons by repressing the plasma membrane Ca(2+)-ATPase-1. *Mol. Endocrinol.* 16, 1629-1637.
- Bhargava, A., Meijer, O.C., Dallman, M.F., Pearce, D., 2000. Plasma membrane calcium pump isoform 1 gene expression is repressed by corticosterone and stress in rat hippocampus. *J. Neurosci.* 20, 3129-3138.
- Bhatia, N., Jaggi, A.S., Singh, N., Anand, P., Dhawan, R., 2011. Adaptogenic potential of curcumin in experimental chronic stress and chronic unpredictable stress-induced memory deficits and alterations in functional homeostasis. *J. Nat. Med.* 65, 532-43.
- Bonan, C.D., 2012. Ectonucleotidases and Nucleotide/Nucleoside Transporters as Pharmacological Targets for Neurological Disorders. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 1, 739-50.
- Burnstock, G., 1978. Do some sympathetic neurones synthesize and release both noradrenaline and acetylcholine? *Prog. Neurobiol.* 11, 205-22.
- Burnstock, G., Krügel, U., Abbracchio, M.P., Illes, P., 2011. Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Prog. Neurobiol.* 2, 229-74.
- Canu, M.H., Darnaudéry, M., Falempin, M., Maccari, S., Viltart, O., 2007. Effect of hindlimb unloading on motor activity in adult rats: Impact of prenatal stress. *Behav. Neurosci.* 121, 177-185.



- Chan, K.M., Delfert, D., Junger, J.D., 1986. Direct colorimetric assay for Ca<sup>2+</sup> -stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157, 375-380.
- de Mendonça, A., Sebastião, A.M., Ribeiro, J.A., 2000. Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res. Rev.* 33, 258–274.
- Egan, R.J., Bergner, C.L., Hart, P.C., Cachat, J.M., Canavello, P.R., Elegante, M.F., Elkhayat, S.I., Bartels, B.K., Tien, A.K., Tien, D.H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z., Kalueff, A.V., 2009. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in *zebrafish*. *Behav. Brain. Res.* 205, 38-44.
- Fleming A., Rubinsztein, D.C., 2011. *Zebrafish* as a model to understand autophagy and its role in neurological disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1812, 520-526.
- Fontella, F.U., Bruno, A.N., Crema, L.M., Battastini, A.M.O., Sarkis, J.J.F., Netto, C.A., Dalmaz, C., 2004. Acute and chronic stress alter ecto-nucleotidase activities in synaptosomes from the rat hippocampus. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 78, 341–347.
- Franco, R., Casadó, V., Ciruela, F., Saura, C., Mallol, J., Canela, E.I., Lluís, C., 1997. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog. Neurobiol.* 4, 283-94.
- Harvey, S.B., Wadsworth, M., Wessely, S., Hotopf, M., 2008 The relationship between prior psychiatric disorder and chronic fatigue: evidence from a national birth cohort study. *Physiol. Med.* 7, 933–940
- Hashiguchi, H., Ye, H.S.H., Morris, M., Alexander, N., 1997. Single and repeated environmental stress: effect on plasma oxytocin, corticosterone, catecholamines and behavior. *Physiol. Behav.* 61, 731–6.
- Hirsch, D., Zukowska, Z., 2012. NPY and stress 30 years later: the peripheral view. *Cell Mol. Neurobiol.* 32, 645-59.

- Horvat, A., Stanojević, I., Drakulić, D., Velicković, N., Petrović, S., Milosević, M., 2010. Effect of acute stress on NTPDase and 5'-nucleotidase activities in brain synaptosomes in different stages of development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 28, 175-82.
- Ingham, P.W., 2009. The power of the *zebrafish* for disease analysis. *Hum. Mol. Genet.* 18,R107-R112.
- Jacobson, K.A., Gao, Z.G., 2006. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 247-64.
- Kennedy, C., Todorov, L.D., Mihaylova-Todorova, S., Sneddon, P., 1997. Release of soluble nucleotidases: a novel mechanism for neurotransmitter inactivation? *Trends Pharmacol. Sci.* 18, 263–6.
- Kyrou, I., Tsigos, C., 2009. Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 787-93
- Latini, S., Pedata, F., 2001. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem.* 79, 463– 84.
- Löhr, H., Hammerschmidt, M., 2011. *Zebrafish* in Endocrine Systems: Recent Advances and Implications for Human Disease. *Annu. Rev. Physiol.* 73, 183–211.
- Lemaire, V., Lamarque, S., Le Moal, M., Piazza, P.V., Abrous, D.N., 2006. Postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampus neurogenesis. *Biol. Psychiatry* 59, 786–792.
- Magarinos, A.M., Verdugo Garcia, J.M., McEwen, B.S., 1997. Chronic restraint stress alters synaptic terminal structure in hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 14002–14008.
- Maragakis, N.J., Rothstein, J.D., 2004. Glutamate transporters: animal models to neurologic Disease. *Neurobiol. Dis.* 15, 461–473.

- Maximino, C., de Brito, T.M., da Silva Batista, A.W., Herculano, A.M., Morato, S., Gouveia, A. Jr., 2010. Measuring anxiety in *zebrafish*: a critical review. *Behav. Brain Res.* 21, 157-171.
- Piato, A.L., Capiotti, K.M., Tamborski, A.R., Oses, J.P., Barcellos, L.J., Bogo, M.R., Lara, D.R., Vianna, M.R., Bonan, C.D., 2011a. Unpredictable chronic stress model in *zebrafish* (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 35, 561-7.
- Piato, A.L., Rosemberg, D.B., Capiotti, K.M., Siebel, A.M., Herrmann, A.P., Ghisleni, G., Vianna, M.R., Bogo, M.R., Lara, D.R., Bonan, C.D., 2011b. Acute restraint stress in *zebrafish*: behavioral parameters and purinergic signaling. *Neurochem. Res.* 10, 1876-86.
- Ren, H., Stiles, G.L., 1999. Dexamethasone stimulates human A1 adenosine receptor (A1AR) gene expression through multiple regulatory sites in promoter. *B. Mol. Pharmacol.* 55, 309–316.
- Rico, E.P., Rosemberg, D.B., Seibt, K.J., Capiotti, K.M., Da Silva, R.S., Bonan, C.D., 2011. *Zebrafish* neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicol. Teratol.* 33, 608-17.
- Rico, E.P., Senger, M.R., Fauth, M. da G., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2003. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of *zebrafish* (*Danio rerio*). *Life Sci.* 73, 2071–82.
- Robson, S.C., Sévigny, J., Zimmermann, H., 2006. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic. Signal.* 2, 409–430.
- Rodrigo, R., Rivera, G., Lucero, Y., Larraguibel, C., 2002. Effect of ethanol on regulation of (Na+K)-adenosine triphosphatase by aldosterone and dexamethasone in cultured renal papillary collecting duct cells. *Endocrine* 19, 301–304.

- Rosemberg, D.B., Rico, E.P., Guidoti, M.R., Dias, R.D., Souza, D.O., Bonan, C.D., Bogo, M.R., 2007. Adenosine deaminase-related genes: molecular identification, tissue expression pattern and truncated alternative splice isoform in adult *zebrafish* (*Danio rerio*). *Life Sci.* 8, 1526–34.
- Rosemberg, D.B., Rico, E.P., Senger, M.R., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Souza, D.O., 2008. Kinetic characterization of adenosine deaminase activity in *zebrafish* (*Danio rerio*) brain. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 151, 96–101.
- 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*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 139, 203–7.
- Shaheen, A.A., Abd El-Fattah, A., Gad, M.Z., 1996. Effect of various stressors on the level of lipid peroxide, antioxidants and Na<sup>+</sup>, K<sup>(+)</sup>-ATPase activity in rat brain. *Experientia* 52, 336–339.
- Souza, A., Detanico, B.C., Medeiros, L.F., Rozisky, J.R., Caumo, W., Hidalgo, M.P., Battastini, A.M., Torres, I.L., 2011. Effects of restraint stress on the daily rhythm of hydrolysis of adenine nucleotides in rat serum. *J. Circadian Rhythms* 9:7.
- Struzynska, L., 2009. A glutamatergic component of lead toxicity in adult brain: the role of astrocytic glutamate transporters. *Neurochem. Int.* 55, 151–156.
- Sun, W.C., Cao, Y., Jin, L., Wang, L.Z., Meng, F., Zhu, X.Z., 2005. Modulating effect of adenosine deaminase on function of adenosine A1 receptors. *Acta Pharmacol. Sin.* 26, 160-5.
- Swaab, D.F., Bao, A.M., Lucassen, P.J., 2005. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res. Rev.* 4, 141–194.

- Tang, R., Dodd, A., Lai, D., McNabb, W.C., Love, D.R., 2007. Validation of *zebrafish* (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta. Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 39, 384–390.
- Torres, I.L.S., Gamaro, G.D., Silveira-Cucco, S.N., Michalowski, M.B., Corrêa, J.B., Perry, M.L.S., Dalmaz, C., 2001. Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO<sub>2</sub> in hippocampal and cerebral cortex slices. *Bras. J. Med. Biol. Res.* 34, 111–6.
- Torres, I.L., Buffon, A., Dantas, G., Furstenau, C.R., Bohmer, A.E., Battastini, A.M., Sarkis, J.J., Dalmaz, C., Ferreira, M.B., 2002. Chronic stress effects on adenine nucleotide hydrolysis in the blood serum and brain structures of rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 74: 181-6.
- Tu, J., Wang, L.P., 2009. Therapeutic potential of extracellular ATP and P2 receptors in nervous system diseases. *Neurosci. Bull.* 1, 27-32.
- Tzingounis, A.V., Wadiche, J.I., 2007. Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nat. Rev. Neurosci.* 129, 35 947.
- Voelter, W., Zech, K., Arnold, P., Ludwig, G., 1980. Determination of selected pyrimidines, purines and their metabolites in serum and urine by reversed-phase ion pair chromatography. *J. Chromatogr.* 199, 345–354.
- Weisman, M.I., Caiolfa, V.R. Parola, A.H., 1988. Adenosine deaminase-complexing protein from bovine kidney. Isolation of two distinct subunits, *J. Biol. Chem.* 263, 5266–5270.
- Wilson, J.M., Bunte, R.M., Carty, A.J., 2009. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in *zebrafish* (*Danio rerio*). *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 48,785–789.
- Zimmermann, H., 2001. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. *Drug Dev. Res.* 52, 44–56.

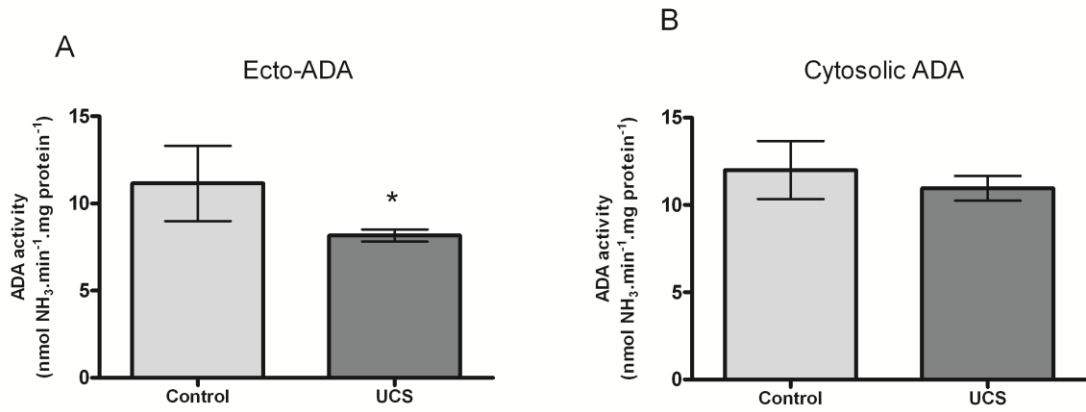
## Figure legends

**Fig. 1.** Effect of unpredictable chronic stress on membrane-bound (A) and soluble (B) ADA activity from *zebrafish* brain. Bars represent the mean  $\pm$  S.D (n=5). The symbol (\*) represents a significant difference from control group (one-way ANOVA, followed by Tukey test as post hoc,  $P < 0.05$ ). The specific enzyme activity is reported as nmol of  $\text{NH}_3 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  of protein.

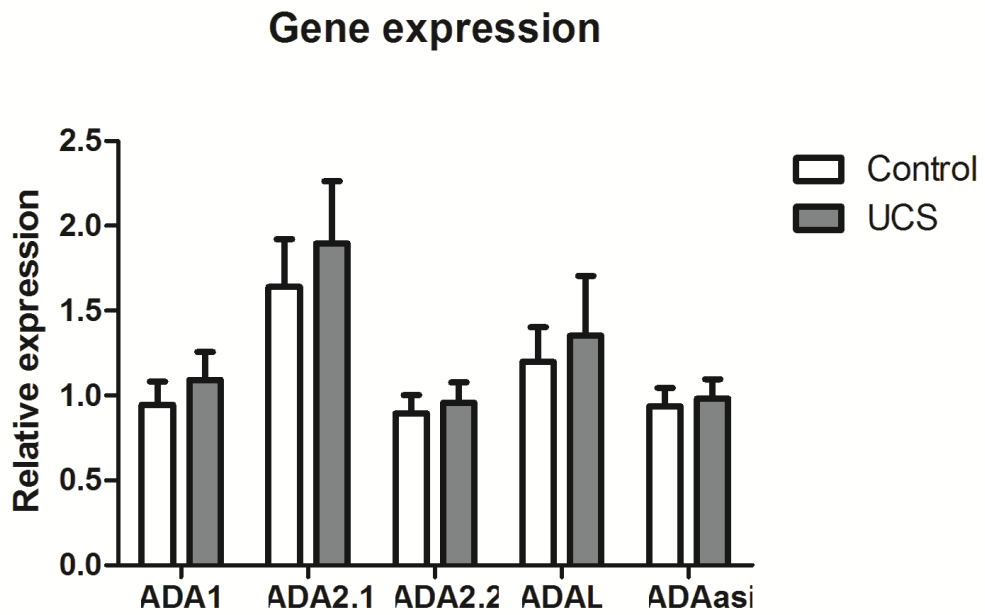
**Fig. 2.** Effect of unpredictable chronic stress on ADA gene expression in *zebrafish* brain. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of four independent experiments (n=4) performed in quadruplicate. Data were analyzed statistically by oneway ANOVA followed by Tukey test as post hoc test. Asterisk indicates statistically significant difference from control group ( $P < 0.05$ ).

**Fig. 3.** Purine metabolites in brain membranes from control and stressed *zebrafish*. Membranes were incubated with 0.1 mM ATP. ATP(A), ADP(B), AMP(C), adenosine (ADO)(D) and inosine (INO)(E) contents in control (black circles) and stressed (black triangles) groups. The results are presented as the mean ( $\mu\text{mol}$ )  $\pm$  SEM. Data represents a typical result of three independent experiments.

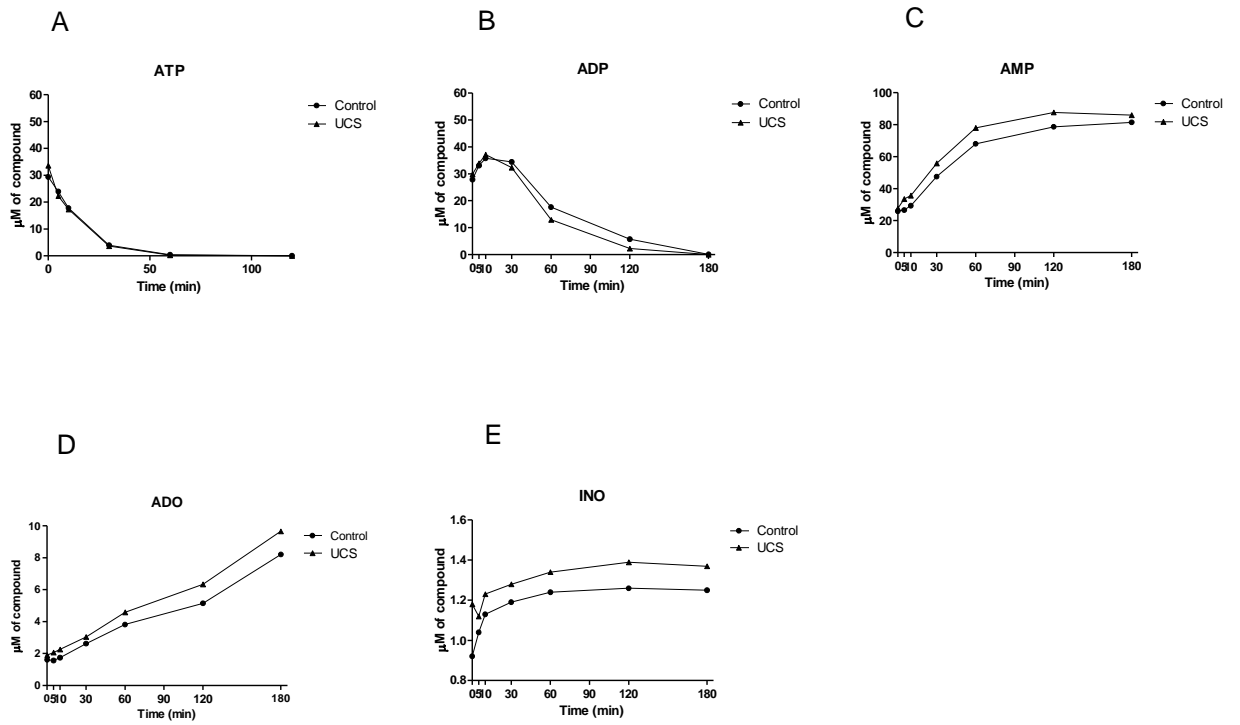
**Figure 1**



**Figure 2**



**Figure 3**



**Table 1.** Procedure of the unpredictable chronic stress in *zebrafish*

Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday	Saturday	Sunday
9:00 am	10:00 am	10:30 am	9:00 am	8:00 am	11:00 am	8:00 am
Restraint stress	Social isolation	Crowding	Low water level	Cooling	Tank change	Heating
2:00 pm	4:00 pm	1:30 pm	3:00 pm	2:00 pm	5:30 pm	12:00 pm
Heating	Cooling	Predator	Tank change	Crowding	Chasing	Social isolation



**Table 2.** PCR primers design

Enzymes	Primer sequences (5'-3')	GenBank accession number (mRNA)
<i>EF1<math>\alpha</math></i> *	F – CTGGAGGCCAGCTCAAACAT R – ATCAAGAAGAGTAGTACCGCTAGCATTAC	NSDART00000023156
<i>Rpl13<math>\alpha</math></i> *	F – TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC R – AGACGCACAATCTTGAGAGCAG	NM_212784
<i><math>\beta</math>-actin</i>	F- CGAGCTGTCTTCCCATCCA R- TCACCAACGTAGCTGTCTTTCTG	ENSDART00000055194
<i>ADA1</i>	F-GCACAGTGAATGAGCCGGCCAC R-AATGAGGACTGTATCTGGCTTCAACG	BC076532.1
<i>ADA2.1</i>	F-TTCAACACCACACGTATCGGGCAC R-ATCAGCACTGCAGCCGGATGATC	AF384217.1
<i>ADAasi</i>	F-CTTTGTGGTACTTCAAGGACGCTTTG R-TTGTAGCAGATAAAAGAAGCGAGACG	AF384217.1
<i>ADA2.2</i>	F-TTGCAATTGTTTCATCATCCCGTAGC R-TCCCGAATAAACTGGGATCATCG	XM_682627.1
<i>ADAL</i>	F-CTCTAATGTGAAAGGTCAAACCGTGC R-AAGACGCCCTTATCATCCGTGC	NM_001033744.1

\* According to Tang et al. (2007).

\*\* Designed by authors.

**Table 3.** Effect of unpredictable chronic stress on ectonucleotidase activities in adult *zebrafish* brain membranes.

Group	<i>n</i>	ATP hydrolysis	<i>n</i>	ADP hydrolysis	<i>n</i>	AMP hydrolysis
Control	8	580.4 $\pm$ 76.7	5	65.8 $\pm$ 14.5	5	18.65 $\pm$ 3.4
Estressed	8	527.2 $\pm$ 62.2	5	58.1 $\pm$ 10.3	5	18.25 $\pm$ 3.9

The nucleotide hydrolysis was expressed as nmol Pi min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein.

Data are expressed as mean  $\pm$  S.D.

## **CAPÍTULO 3**

### **RESULTADOS ADICIONAIS**

Além dos experimentos incluídos no manuscrito do Capítulo 2, experimentos adicionais foram realizados. Considerando o importante efeito neuroprotetor e neuromodulatório da adenosina e seu envolvimento com a ansiedade, evidências sugerem que agonistas de receptores  $A_1$  tem uma atividade ansiolítica e que antagonistas dos receptores  $A_{2A}$  podem exercer efeitos neuroprotetores (Fredholm et al., 2011; Cunha, 2005). Portanto, torna-se importante investigar o efeito da administração de um agonista do receptor  $A_1$ ,  $N^6$ -ciclopentiladenosina (CPA), e de um antagonista de receptor  $A_{2A}$ , ZM241385, em parâmetros comportamentais de animais submetidos ao estresse crônico imprevisível, a fim de verificar uma possível relação entre o sistema purinérgico e o estresse, bem como uma maior compreensão da função da adenosina na modulação do estresse e ansiedade. Portanto, uma interessante estratégia farmacológica envolve o bloqueio dos receptores  $A_{2A}$  e a ativação dos receptores  $A_1$  como forma de promover a neuroproteção baseada na modulação do sistema adenosinérgico.

O protocolo de estresse crônico imprevisível padronizado em *zebrafish* é uma importante ferramenta para avaliar os efeitos do estresse crônico neste modelo (Piato et al, 2011a).

No modelo de estresse imprevisível, os animais foram submetidos duas vezes ao dia à tarefas estressoras durante 7 dias, como mostra a tabela 2, abaixo:

Tabela 2: Esquema das tarefas do modelo de estresse crônico imprevisível.

	Segunda	Terça	Quarta	Quinta	Sexta	Sábado	Domingo
<b>Tarefas 1</b>	9:00 Contenção	10:00 Isolamento Social	10:30 Excesso populacional	9:00 Baixo nível de água	8:00 Exposição ao frio	11:00 Mudança de Tanque	8:00 Exposição ao calor
<b>Tarefas 2</b>	14:00 Exposição ao calor	16:00 Exposição ao frio	13:30 Predador	15:00 Troca de água	14:00 Excesso populacional	17:30 Caça	12:00 Isolamento Social

As tarefas estressoras consistiram de:

1. Contenção: onde cada animal será acondicionado durante 90 min dentro de um pequeno tubo de microcentrífuga de 2 ml aberto nas duas extremidades com fluxo constante de água e temperatura controlada;
2. Exposição ao calor: os animais serão mantidos em um aquário com água na temperatura de 33 °C durante 30 min;
3. Isolamento social: cada animal será mantido sozinho em um Becker de 250 ml por 45 min;
4. Exposição ao frio: os animais serão mantidos em um aquário com água na temperatura de 23 °C durante 30 min;
5. Excesso populacional: um número de 10 peixes será mantido por 50 min em um Becker de 250 ml;
6. Exposição ao predador: um peixe, *Archocentrus nigrofasciatus*, será exposto próximo aos animais, mas sem contato direto, durante 50 min;
7. Baixo nível de água: em um aquário os peixes ficarão durante 2 min em baixo nível de água, aproximadamente 3 cm;
8. Mudança de tanque: serão realizadas três trocas consecutivas em tanques diferentes permanecendo 8 min em cada tanque;
9. Troca de água do aquário: a água do aquário será trocada três vezes consecutivas, e
10. Caça: com o auxílio de uma rede os animais serão caçados durante 8 min.

Vinte e quatro horas após o término do protocolo do estresse crônico imprevisível as drogas foram administradas via i.p em um volume de 10µL. Os compostos utilizados foram

CPA (10 µg/kg) e ZM241385 (100 µg/kg). CPA foi dissolvido em uma solução salina (0.9%) e ZM241385 em DMSO (0.08%). Logo após, os animais tratados foram cuidadosamente colocados individualmente no tanque novo (30 cm × 15 cm × 10 cm, comprimento × altura × largura). Primeiramente, foram habituados ao aparato por 30 s e então a atividade comportamental foi gravada ao longo de um período de 5 min. O tanque de teste foi dividido em quatro áreas igualmente verticais e uma horizontal, e os padrões comportamentais a seguir foram medidos: número de cruzamentos (linhas verticais e horizontais), distância total percorrida, velocidade máxima e tempo gasto no quadrante superior. O tempo despendido em cada posição do aquário (níveis inferiores versus superiores) foi considerado como o índice de ansiedade. Esta tarefa explora a tendência natural que o *zebrafish* tem para, inicialmente, permanecer na parte inferior de um ambiente novo e, em seguida, gradualmente explorar as partes superiores do tanque teste (Egan et al., 2009; Levin et al., 2007). Desta forma, um aumento no tempo em que o animal permanece no fundo do tanque indica um comportamento do tipo ansioso elevado (Levin et al., 2007). Os vídeos foram gravados com uma webcam digital (Quick cam Pro 9000, LOGITECH) e o movimento de cada animal foi monitorado pelo software ANY-Maze (Stoelting co., Wood Dale, IL, EUA). Os dados foram expressos como média ± erro padrão, sendo que foram analisados por análise de variância de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni.

Os resultados obtidos mostram a atividade locomotora e comportamento do tipo ansioso após a administração de CPA em animais submetidos ao UCS (Fig. 1).

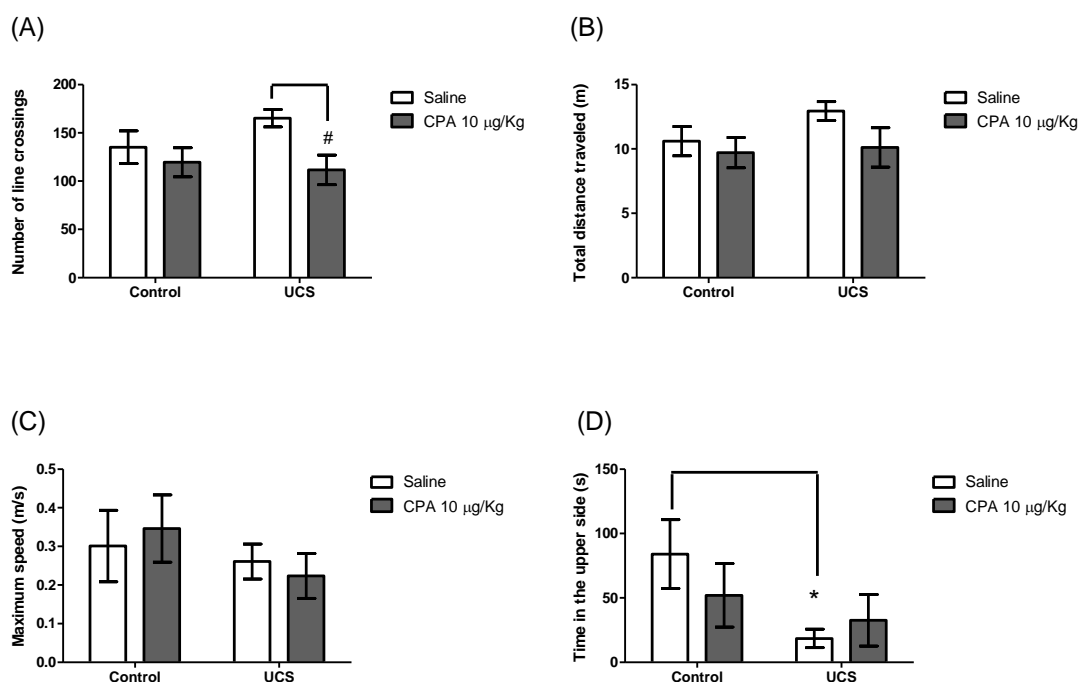


Fig. 1. Efeito da administração de CPA sobre a atividade locomotora e comportamento do tipo ansioso em animais submetidos ao UCS. (A) número de cruzamentos, (B) distância percorrida (m), (C) velocidade máxima (m/s) e (D) tempo permanecido na região superior (s). Os resultados são expressos em média  $\pm$ SEM. Valores de no mínimo 10 animais por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância de duas vias. Múltiplas comparações foram realizadas pelo método de Bonferroni com UCS e drogas como fatores. \* $P < 0.05$  indica diferença significativa entre o respectivo controle e UCS-salina e # representa diferença significativa entre UCS-drogas.

Conforme mostra a Fig.1 (A, B, C) a atividade locomotora não foi alterada nos animais submetidos ao UCS, pois não houve uma mudança significativa, respectivamente, no número de cruzamentos [ $F(3;45)=0,6107$ , ( $p=0,4386$ )]; distância percorrida [ $F(3;45)=1,344$ , ( $p= 0,2523$ )] e velocidade máxima [ $F(3;45)=1,260$ , ( $p= 0,2675$ )].

No entanto, após a administração do agonista de receptor de adenosina  $A_1$ , CPA, no grupo de animais estressados, houve uma diminuição no número de cruzamentos [F(3;45)=5,895, (p=0,0192)], indicando que esse agonista diminui a atividade locomotora em animais estressados (Fig. 1.A). Portanto, a redução da atividade locomotora, provocada pelo CPA parece ser relacionada a efeitos específicos da droga na condição estudada. Na Fig. 1.D, pode ser observado um aumento no tempo de permanência na parte inferior do tanque nos animais estressados [F(3;45)4,200 (p= 0,0463)], sugerindo um comportamento do tipo ansioso que não foi revertido pela administração de CPA.

A atividade locomotora e o comportamento do tipo ansioso foram avaliados após a administração de ZM241385 em animais submetidos ao UCS (Fig. 2).

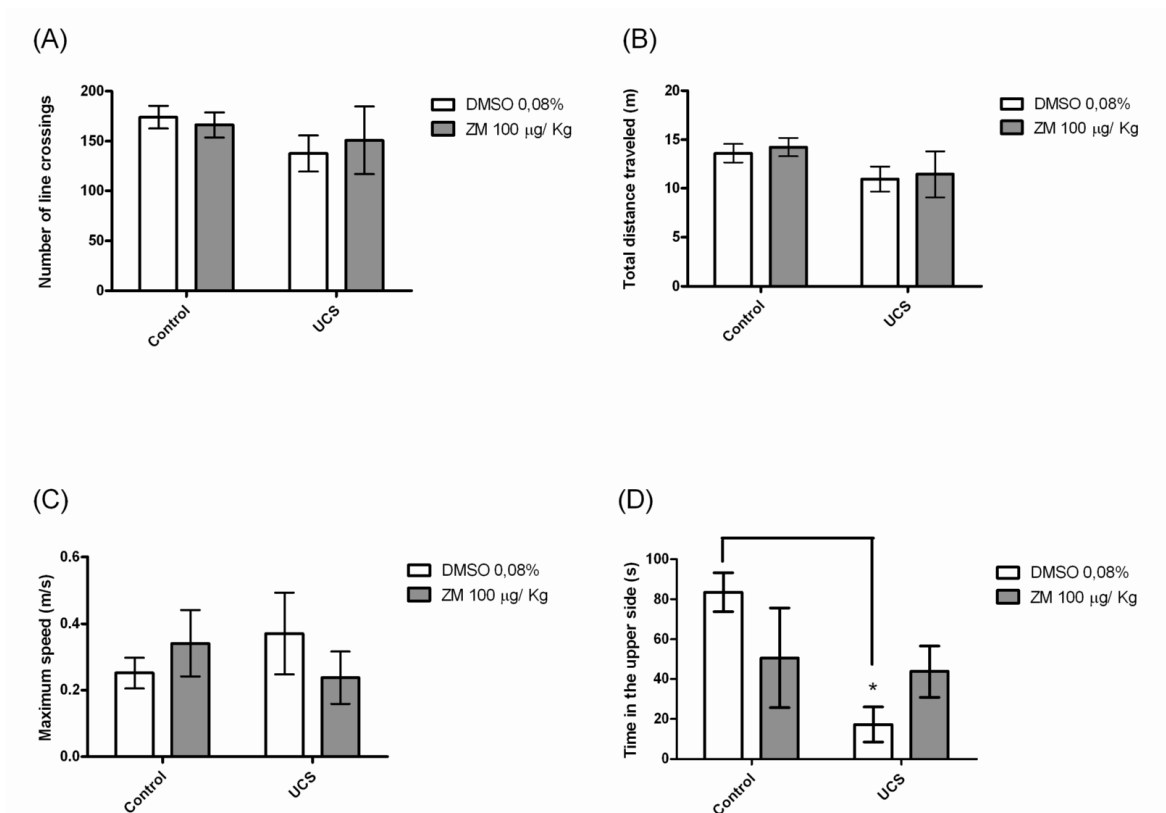


Fig. 2. Efeito da administração de ZM sobre a atividade locomotora e comportamento do tipo ansioso em animais submetidos ao UCS. (A) número de cruzamentos, (B) distância percorrida

(m), (C) velocidade máxima (m/s) e (D) tempo permanecido na região superior (s). Os resultados são expressos em média  $\pm$ SEM. Valores de no mínimo 7 animais por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância de duas vias. Múltiplas comparações foram realizadas pelo método de Bonferroni com UCS e drogas como fatores. \* $P < 0.05$  indica diferença significativa entre o respectivo controle e UCS-salina.

Conforme mostra a Fig.2 (A, B, C), a atividade locomotora não foi alterada nos animais submetidos ao UCS, pois não houve uma mudança significativa, respectivamente, no número de cruzamentos [F(3;32)=1,526,  $p= 0,2256$ ]; distância percorrida [F(3;32)=3,283,  $p= 0,0794$ ] e velocidade máxima [F(3;32)=3,209,  $p= 0,0827$ ].

A Fig. 2.D mostra que o UCS causou um aumento no tempo de permanência na parte inferior do tanque nos animais estressados, sem administração dos compostos [(F(3;33)=5,055,  $p= 0,0314$ )] indicando assim um aumento no comportamento do tipo ansioso.

Estudos realizados em ratos mostram que há o envolvimento de receptor de adenosina  $A_1$  na atividade motora, comportamento exploratório, ansiedade e agressividade (Giménez-Llort et al., 2002). Portanto, a redução da atividade locomotora provocada pelo CPA parece ser relacionada aos efeitos específicos do agonista na condição estudada. Já que os animais estressados são submetidos a diversos estímulos estressores capazes de modificar o metabolismo da adenosina (conforme dados do capítulo 2), o SNC desses animais pode ser mais suscetível a alterações neuroquímicas e comportamentais.

Esses resultados preliminares sugerem que nas condições testadas os compostos não foram capazes de reverter o efeito ansiogênico causado pelo UCS, não havendo assim uma modulação direta do sistema adenosinérgico sobre a ansiedade causada pelo UCS.

Alguns trabalhos demonstram que sob condições nocivas, como hipóxia e isquemia, pode ocorrer uma rápida dessensibilização dos receptores de adenosina  $A_1$  - mediada pela



inibição da transmissão sináptica provavelmente devido a uma internalização dos receptores de adenosina  $A_1$  em terminais nervosos (Coelho et al., 2006). O curso de tempo de dessensibilização dos receptores de adenosina  $A_1$  é particularmente crítico para entender se a adenosina mantém sua eficiência neuroprotetora em situações nocivas crônicas no cérebro (Cunha et al., 2005).

Cunha (2005) sugere que a ativação dos receptores  $A_1$  é proeminente em situações de estresse agudo, mas pode ter uma diminuição na eficiência após longos períodos de tempo de insultos, como o que ocorre com o estresse crônico. Parece que a ativação dos receptores de adenosina  $A_1$  é um sistema de neuroproteção endógena, mas sua utilidade é limitada às condições nocivas agudas no cérebro, ou seja, para controlar o aparecimento ou aumentar o limite de dano neuronal.

Torres et al., (2003) sugere que a exposição repetitiva ao estresse por contenção poderia induzir uma resposta adaptativa em animais cronicamente estressados, o que poderia levar a essa dessensibilização dos receptores de adenosina. Portanto, a ausência de efeito, em relação à ansiedade, dos compostos testados em animais estressados pode ser devido a uma diminuição da eficiência dos receptores de adenosina  $A_1$ . Além disso, é possível que o estresse diminua a expressão de receptores  $A_1$ , promovendo uma diminuição da locomoção, sendo que este feito se torna mais evidente na presença de CPA, que é um agonista seletivo dos receptores  $A_1$ . Na ausência do CPA, este efeito não é observado, pois o aumento nos níveis de adenosina induzidos pelo estresse poderia promover uma ação combinada dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$ , não sendo observada esta redução na locomoção. Como mostram os resultados encontrados no capítulo 2 referente ao metabolismo de ATP, há um aumento nos níveis de adenosina nos animais estressados. Dessa forma, podemos sugerir que este aumento nos níveis de adenosina pode interferir na função dos receptores adenosinérgicos.

Com a finalidade de complementar esse estudo e aprofundar o conhecimento sobre a modulação adenosinérgica, pretendemos ainda investigar os efeitos de antagonistas do receptor  $A_1$ , como o DPCPX (8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina), e agonistas do receptor de adenosina  $A_{2A}$ , entre eles o CGS21680 (2-[*p*-2-(carboniletil)feniletilamino]-5'-*N*-etillcarboxamidoadenosina) e possíveis associações entre esses compostos para analisar estratégias farmacológicas. Com base nos resultados preliminares encontrados é interessante verificar se a expressão gênica dos receptores  $A_1$  a  $A_{2A}$  em encéfalo de *zebrafish* está alterada pelo UCS, uma vez que o CPA e o ZM241385 parecem não exercer efeito sobre a ansiedade em animais submetidos a esse protocolo.

## **CAPÍTULO 4**

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O protocolo de UCS aumenta os níveis de ansiedade, prejudica a função cognitiva, aumenta o CR, diminui a expressão de GR e aumenta os níveis de cortisol no *zebrafish* (Piato et al., 2011a). Além disso, estudos recentes têm demonstrado que os hormônios corticosteróides interagem com vários sistemas de neurotransmissores, incluindo o sistema purinérgico, em que a expressão de receptores de adenosina A<sub>1</sub> é modificada (Ren & Stiles, 1999). A relação entre o estresse crônico e seus efeitos na sinalização purinérgica no *zebrafish* foram estudados nesta dissertação.

Considerando que os nucleosídeos e nucleotídeos de adenina estão envolvidos na modulação de vários processos fisiológicos e patológicos, e seus níveis podem ser alterados pelo estresse em algumas situações, foi importante investigar a interação entre o catabolismo extracelular de nucleotídeos e nucleosídeos e o UCS. No Capítulo 2, o protocolo de UCS foi utilizado a fim de verificar seu efeito sobre a via das ectonucleotidases e ADA em cérebro de *zebrafish*. Além disso, foi realizada uma análise sobre o metabolismo do ATP, bem como a expressão dos genes *ada<sub>1</sub>*, *ada<sub>2.1</sub>*, *ada<sub>2.2</sub>*, *ada<sub>L</sub>* e *ada<sub>asi</sub>* no cérebro de *zebrafish*. Posteriormente, considerando que estudos demonstram que os agonistas de receptores A<sub>1</sub> têm uma atividade ansiolítica e os antagonistas dos receptores A<sub>2A</sub> podem exercer efeitos neuroprotetores, investigamos o efeito da administração de um agonista do receptor A<sub>1</sub>, N<sup>6</sup>-ciclopentiladenosina (CPA), e de um antagonista de receptores A<sub>2A</sub>, (ZM241385) em parâmetros comportamentais de animais submetidos ao estresse crônico imprevisível, para verificar uma possível relação entre o sistema adenosinérgico e o estresse. Nossos resultados preliminares demonstraram que os receptores A<sub>1</sub> e A<sub>2A</sub> não promoveram um efeito ansiolítico nos animais estressados, uma vez que os mesmos continuaram apresentando um comportamento do tipo ansioso após a administração de agonistas destes receptores.

Nossos resultados demonstraram que a atividade da ecto-ADA foi alterada em cérebro de *zebrafish* submetidos ao protocolo de UCS. As atividades da ADA citosólica, NTPDase e

5'-nucleotidase não demonstraram alterações significativas após UCS. No entanto, a análise do metabolismo de nucleotídeos e nucleosídeos mostrou um aumento marcante nos níveis de adenosina nas membranas de cérebro dos animais expostos a UCS quando comparado ao grupo controle. Vários trabalhos mostram as atividades ectonucleotidásicas estão alteradas após o estresse agudo (Fontella et al., 2004; Horvat et al., 2010; Souza et al., 2011). Souza et al. (2011) verificaram uma diminuição tempo-dependente nas atividades das NTPDases e 5'-nucleotidase em soro de ratos após exposição ao estresse agudo, sendo que esse efeito parece persistir por pelo menos 24 horas. Fontella et al. (2004) observaram uma maior hidrólise de ATP, ADP e AMP em sinaptossomas hipocâmpais de ratos induzida por estresse agudo. Piatto et al. (2011b) mostraram que *zebrafish* submetidos ao estresse agudo por contenção (ARS) tiveram um aumento significativo na hidrólise de ATP. É bem descrita a influência dos glicocorticoides no cérebro, sendo que podem alterar a atividade de outras enzimas envolvidas na hidrólise do ATP, já que os níveis elevados de glicocorticoides ou a exposição ao estresse agudo aumentou a atividade da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase no cérebro e outros tecidos (Sousa et al., 1996; Rodrigo et al., 2002), e diminuiu a atividade da Ca<sup>2+</sup>-ATPase em hipocampo de ratos (Bhargava et al., 2000, 2002). Böhmer et al., (2003) também demonstraram aumento na atividade das ectonucleotidases em estresse agudo. No entanto, nossos resultados demonstram que a atividade de hidrólise das ectonucleotidases não foi alterada após o protocolo de UCS. A diferença entre os resultados apresentados nesta dissertação (modelo de estresse crônico imprevisível) e os encontrados na literatura (modelos de estresse agudo) pode ser justificada conforme Torres et al. (2001). Neste estudo, animais cronicamente estressados não tiveram as consequências hormonais que animais expostos a um único episódio de estresse apresentaram (Torres et al., 2001) e este fenômeno de adaptação ao estresse crônico pode refletir em diversos processos bioquímicos e fisiológicos (Hashiguchi et al., 1997), incluindo a hidrólise de nucleotídeos.

Nós demonstramos que o UCS diminuiu a atividade da ecto-ADA no cérebro de *zebrafish*, mas não houve alterações no controle transcricional, já que expressão dos genes relacionados à ADA não foi alterada. Piato et al. (2011a) encontrou um resultado similar aos encontrados nessa dissertação com relação à atividade da enzima ADA. Esse estudo demonstrou que após o estresse agudo por contenção houve uma diminuição da atividade da ADA citosólica. Além disso, a análise no metabolismo do ATP mostra que há um aumento nos níveis de adenosina, corroborando com os dados obtidos para a atividade da ecto-ADA. Juntos, estes achados podem indicar que o estresse é capaz de alterar os níveis de adenosina. Conforme Jacobson & Gao (2006) a adenosina cerebral é liberada sob condições de estresse, podendo neutralizar os efeitos prejudiciais de neurotransmissores excitatórios, como o glutamato, pela ativação dos receptores de adenosina A<sub>1</sub>, que reduz a liberação de neurotransmissores e deprime a atividade neuronal no SNC. Magarinos et al. (1997) sugere que o estresse crônico por contenção aumenta a liberação de glutamato. Sendo assim, uma possível neurotoxicidade induzida pelo estresse pode ser minimizada pelos efeitos neuroprotetores da adenosina, especialmente associado à ativação de receptores de adenosina A<sub>1</sub> (de Mendonça et al., 2000). Portanto, a diminuição da atividade da ecto-ADA observada em nossos resultados pode levar a um aumento nos níveis de adenosina extracelular. Estes achados suportam a hipótese de que o efeito modulatório sobre ecto-ADA pode estar relacionado com um mecanismo de compensação a fim de restabelecer a homeostase e uma mudança no pool de adenosina, que pode influenciar os efeitos neuroprotetores produzidos por este nucleosídeo no encéfalo de *zebrafish*.

No capítulo 3, os resultados preliminares sugerem que nas condições testadas os compostos CPA, agonista de receptor A<sub>1</sub>, e ZM241385, antagonista de receptor A<sub>2A</sub>, não foram capazes de reverter o efeito ansiogênico causado pelo UCS. De acordo com Coelho et al. (2006) sob condições nocivas, como hipóxia e isquemia, pode ocorrer uma rápida

dessensibilização dos receptores de adenosina A<sub>1</sub> - mediada pela inibição da transmissão sináptica provavelmente devido a uma internalização dos receptores de adenosina A<sub>1</sub> em terminais nervosos. Essa internalização dos receptores A<sub>1</sub> poderia levar a ineficiência do possível efeito ansiolítico do CPA, observada nesta dissertação. O aumento dos níveis de adenosina, conforme observado no capítulo 2, poderia levar a uma saturação dos receptores de adenosina A<sub>1</sub>, causando a sua internalização.

Os resultados apresentados nesta dissertação revelam que a alteração nos níveis de adenosina faz parte da resposta patofisiológica induzida pelo modelo de UCS. Além disso, nossos resultados indicam que há diferenças entre o metabolismo de nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares após a exposição ao estresse crônico, diferindo dos efeitos descritos previamente após indução do estresse agudo em *zebrafish*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbracchio MP, Burnstock. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther.* 1994; 64: 445–475.
- Abbracchio MP, Burnstock G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol.* 1998; 78:113-145.
- Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, Zimmermann H. Purinergic signalling in the nervous system: an overview. *Trends Neurosci.* 2009; 32:19-29.
- Abrahám, I, Harkany T, Horvath KM, Veenema AH, Penke B, Nyakas C, Luiten PG. Chronic corticosterone administration dose-dependently modulates Abeta (1-42) - and NMDA-induced neurodegeneration in rat magnocellular nucleus basalis. *J Neuroendocrinol.* 2000; 12: 486-494.
- Aisa B, Gil-Bea FJ, Marcos B, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. Neonatal stress affects vulnerability of cholinergic neurons and cognition in the rat: involvement of the HPA axis. *Psychoneuroendocrinology.* 2009; 34:1495-505.
- Alderman SL, Bernier NJ. Ontogeny of the corticotropin-releasing factor system in *zebrafish*. *Gen Comp Endocrinol.* 2009;164:61-69.
- Alsop D, Vijayan MM. Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in *zebrafish*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 294:R711–9.
- Alsop D, Vijayan MM. Molecular programming of the corticosteroid stress axis during *zebrafish* development. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2009a; 153:49–54.
- Alsop D, Vijayan M. The *zebrafish* stress axis: molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event. *Gen Comp Endocrinol.* 2009b; 161:62–6.
- Amsterdam A, Hopkins N. Mutagenesis strategies in *zebrafish* for identifying genes involved in development and disease. *Trends in Genet.* 2006; 22:473-478.
- Appelbaum L, Skariah G, Mourrain P, Mignot E. Comparative expression of P2x receptors and ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in hypocretin and sensory neurons in *zebrafish*. *Brain Res.* 2007; 1174: 66-75.
- Arendash GW, Cao C. Caffeine and coffee as therapeutics against Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.* 2010; 20: 117–126.
- Baroja-Mazo A, Barberà-Cremades M, Pelegrín P. The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1828:79-93.



- Belai A, Burnstock G. Evidence for coexistence of ATP and nitric oxide in non-adrenergic, non-cholinergic (NANC) inhibitory neurones in the rat ileum, colon and anococcygeus muscle. *Cell Tissue Res.* 1994 ; 278: 197–200.
- Bencan Z, Sledge D, Levin ED Bupirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a *zebrafish* model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009; 94:75–80 .
- Bao AM, Meynen G, Swaab DF. The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. *Brain Res Rev.* 2008; 57, 531–553.
- Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun, E., Bedell JA., Mcpherson JA, Johnson SL. The syntenic relationship of the *zebrafish* and human genomes. *Genome Res.* 2000; 10:1351-1358.
- Beliaeva NF, Kashirtseva VN, Medvedeva NV, Khudoklinova IuIu, Ipatova OM, Archakov AI. *Zebrafish* as a model organism for biomedical studies. *Biomed Khim.* 2010; 1:120-31.
- Bhargava, A., Meijer, O.C., Dallman, M.F., Pearce, D. Plasma membrane calcium pump isoform 1 gene expression is repressed by corticosterone and stress in rat hippocampus. *J. Neurosci.* 2000; 20: 3129-3138.
- Bhargava A, Mathias RS, McCormick JA, Dallman MF, Pearce D.. Glucocorticoids prolong Ca(2+) transients in hippocampal-derived H19-7 neurons by repressing the plasma membrane Ca(2+)-ATPase-1. *Mol Endocrinol.* 2002; 16: 1629-1637.
- Bhatia N, Jaggi AS, Singh N, Anand P, Dhawan R. Adaptogenic potential of curcumin in experimental chronic stress and chronic unpredictable stress-induced memory deficits and alterations in functional homeostasis. *J Nat Med.* 2011; 65: 532-43.
- Boehmler W, Petko J, Woll M, Frey C, Thisse B, Thisse C, Canfield VA, Levenson R. Identification of *zebrafish* A2 adenosine receptors and expression in developing embryos. *Gene Expr Patterns.* 2009; 9: 144-151.
- Böhmer AE, Fürstenau CR, Torres IL, Crema L, Battastini AM, Dalmaz C, Ferreira MB, Sarkis JJ. The effect of stress upon hydrolysis adenine nucleotides in blood serum of rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003; 75: 467-71.
- Bonan CD. Ectonucleotidases and Nucleotide/Nucleoside Transporters as Pharmacological Targets for Neurological Disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2012; 1: 739-50.
- Burnstock G. Purinergic Nerves. *Pharmacol Rev.* 1972; 24: 509-581.
- Burnstock G. Do some sympathetic neurones synthesize and release both noradrenaline and acetylcholine? *Prog Neurobiol.* 1978; 11: 205-22.
- Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach* New York: Raven Press. 1978; 45: 107-118.

- Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol.* 1985 ; 16: 433–440.
- Burnstock G Noradrenaline and ATP as cotransmitters in sympathetic nerves. *Neurochem Int.* 1990 ; 17: 357–368.
- Burnstock G. Purinoceptors: ontogeny and phylogeny. *Drug Dev Res.* 1996; 39: 204-242.
- Burnstock G, Knight, GE. Cellular Distribution and Functions of P2 Receptor Subtypes In Different Systems. *Rev Cytol Clin.* 2004 ; 240: 231–304.
- Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci.* 2006; 27: 166-76.
- Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64: 1471–1483.
- Burnstock G. Purinergic Signalling And Disorders Of The Central Nervous System. *Nat Rev Drug Discov.* 2008; 7: 575-590.
- Burnstock G. Purinergic cotransmission. *F1000 Biol Rep.* 2009; 9: 1-46.
- Burnstock G. Control of vascular tone by purines and pyrimidines. *Br J Pharmacol.* 2010; 161: 527-9.
- Burnstock G, Verkhratsky A Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death. *Cell Death Dis.* 2010; 1: e9.
- Burnstock G, Krügel U, Abbracchio MP, Illes P. Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Prog. Neurobiol.* 2011; 2: 229-74.
- Burnstock G, Kennedy C. P2X receptors in health and disease. In: Jacobson KA, Linden J (eds). *Purine and Pyrimidine Receptor Pharmacology.* Academic Press: Burlington, 2011; 333–372.
- Burnstock G. Discovery of purinergic signalling, the initial resistance and current explosion of interest. *Br J Pharmacol.* 2012; 167: 238-55.
- Buynitsky T, Mostofsky DI. Restraint stress in bio behavioral research: recent developments. *Neurosci Biobehav Rev.* 2009; 33: 1089–1098.
- Canu MH, Darnaudéry M, Falempin M, Maccari S, Viltart O. Effect of hindlimb unloading on motor activity in adult rats: Impact of prenatal stress. *Behav Neurosci.* 2007; 121: 177-185.
- Cannon WB. Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev.* 1929; 9: 39-431.
- Champagne DL, Hoefnagels CC, de Kloet RE, Richardson MK. Translating rodent behavioral repertoire to *zebrafish* (*Danio rerio*): relevance for stress research. *Behav Brain Res.* 2010; 214: 332–342.

- Chen W, Guidotti G. Soluble apyrases release adp during ATP hydrolysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 23: 90-5.
- Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *J Am Med Assoc.* 1992; 267 :1244–1252.
- Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol.* 2009; 5: 374-381.
- Coelho JE, Rebola N, Fragata I, Ribeiro JA, de Mendonça A, Cunha RA. Hypoxia-induced desensitization and internalization of adenosine A1 receptors in the rat hippocampus. *Neuroscience.* 2006; 138: 1195-203.
- Cunha GM, Canas PM, Oliveira CR, Cunha RA. Increased density and synapto-protective effect of adenosine A2A receptors upon sub-chronic restraint stress. *Neuroscience.* 2006; 141: 1775-81.
- 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: 107-125.
- Cunha RA. Neuroprotection by adenosine in the brain: from A1 receptor activation to A2A receptor blockade. *Purinergic Signal.* 2005; 1: 111–134.
- da Silva Torres IL, Bonan CD, Crema L, De Leon Nunes M, Battastini AM, Sarkis JJ, Dalmaz C, Ferreira MB. Effect of drugs active at adenosine receptors upon chronic stress-induced hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol.* 2003; 481: 197-201.
- Daly JW. Adenosine receptors. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* 1985 ; 19: 29–46.
- Dall'igna OP, Porciúncula LO, Souza DO, Cunha RA, Lara DR. Neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor blockade of amyloid neurotoxicity. *Br J Pharmacol.* 2003; 138: 1207–1209.
- Das A, Rai D, Dikshit M, Palit G, Nath C. Nature of stress: Differential effects on brain acetylcholinesterase activity and memory in rats. *Life Sci.* 2005; 77: 2299–2311.
- de Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6: 463-75.
- de Mendonça A, Sebastião AM, Ribeiro JA. Adenosine: does it have a neuroprotective role after all? *Brain Res Brain Res Rev.* 2000; 33: 258-7
- Diaz-Hernandez M, Cox JA, Migita K, Haines W, Egan TM, Voigt MM. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 4: 849-53.
- Drury AN, Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol.* 1929; 68: 213–237.

- Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavello PR, Elegante MF, et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in *zebrafish*. *Behav Brain Res*. 2009; 205: 38–44.
- Fitzpatrick F, Christedd N, Durant S, Dardenne M, Nunez EA, HomoDelarche F. Glucocorticoids in the nonobese diabetic (NOD) mouse: basal serum levels, effect of endocrine manipulation and immobilization stress. *Life Sci*. 1992; 50: 1063–1069.
- Florio C, Prezioso A, Papaioannou A, Vertua R. Adenosine A1 receptors modulate anxiety in CD1 mice. *Psychopharmacology (Berl.)*. 1998; 136: 311–319.
- Franco R, Casadó V, Ciruela F, Saura C, Mallol J, Canela EI, Lluís C. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog Neurobiol*. 1997; 4: 283–94.
- Fredholm BB, Lerner U. Metabolism of adenosine and 20-deoxyadenosine by fetal mouse calvaria in culture. *Med Biol*. 1982; 60: 267–271.
- Fredholm BB. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine. *Pharmacol Toxicol*. 1995;76: 93–101.
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*. 2001; 53: 527–552.
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Linden J, and Müller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update. *Pharmacol Rev*. 2011; 63:1-34.
- Froehlicher M, Liedtke A, Groh KJ, Neuhauss SC, Segner H, Eggen RI. *Zebrafish* (*Danio rerio*) neuromast: Promising biological endpoint linking developmental and toxicological studies. *Aquat Toxicol*. 2009; 13: 307-19.
- Gao ZG, Jacobson KA. Emerging adenosine receptor agonists: an update. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2011; 16: 597-602.
- Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav*. 2000; 67: 773–782.
- Gerlai R. Zebra fish: an uncharted behavior genetic model. *Behav Genet*. 2003; 33: 461–468.
- Giménez-Llort L, Fernández-Teruel A, Escorihuela RM, Fredholm BB, Tobeña A, Pekny M, Johansson B. Mice lacking the adenosine A1 receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. *Eur J Neurosci*. 2002; 16: 547-50.
- Ghisleni G, Capiotti KM, Da Silva RS, Oses JP, Piato ÂL, Soares V, Bogo MR, Bonan CD. The role of CRH in behavioral responses to acute restraint stress in *zebrafish*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2012; 10: 176-82.

- Goldstein DS The autonomic nervous system in health and disease. Marcel Dekker. 2001. Inc., New York, NY.
- Goldstein DS, McEwen B. Allostasis, homeostats, and the nature of stress. *Stress*. 2002; 5: 55–58.
- Goldstein DS. Adrenal responses to stress. *Cell Mol Neurobiol*. 2010; 30: 1433–1440.
- Gorzalka BB, Hill MN, Hillard CJ. Regulation of endocannabinoid signaling by stress: implications for stress-related affective disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2008; 32: 1152–1160.
- Grassi Milano E, Basari F, Chimenti C. Adrenocortical and adrenomedullary homologs in eight species of adult and developing teleosts: morphology, histology, and immunohistochemistry. *Gen Comp Endocrinol*. 1997; 108: 483–96.
- Griffiths BB, Schoonheim PJ, Ziv L, Voelker L, Baier H, Gahtan E. A *zebrafish* model of glucocorticoid resistance shows serotonergic modulation of the stress response. *Front Behav Neurosci*. 2012; 6: 68.
- Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joëls M. Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. *J Endocrinol*. 209:153-67, 2011.
- Grosell M, Wood CM. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *J Exp Biol*. 2002; 205: 1179-1188.
- Guo, S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from *zebrafish*? *Genes Brain Behav*. 2004; 3: 63–74.
- Jia SJ, Meng AM. The development of *zebrafish* research in China]. *Yi Chuan*. 2012; 34: 1082-8.
- Joëls M, Karst H, Krugers HJ, Lucassen PJ. Chronic stress: implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Front Neuroendocrinol*. 2007; 28 : 72-96.
- Joëls M, Baram TZ. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci*. 2009; 10: 459-466.
- Joëls M. Impact of glucocorticoids on brain function: relevance for mood disorders. *Psychoneuroendocrinology*. 2011; 36: 406-14.
- Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, Gimenez-Llort L, Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ, Hardemark A, Betsholtz C, Herlenius E, Fredholm BB. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2001 ; 98: 9407–9412.
- Juruena MF, Cleare AJ, Bauer ME, Pariante CM: Molecular mechanisms of glucocorticoid receptor sensitivity and relevance to affective disorders. *Acta Neuropsychiatrica* 2003; 15: 354–367.

- Harvey SB, Wadsworth M, Wessely S, Hotopf M. The relationship between prior psychiatric disorder and chronic fatigue: evidence from a national birth cohort study. *Psychol Med.* 2008; 7: 933–940.
- Hashiguchi H, Ye HSH, Morris M, Alexander N. Single and repeated environmental stress: effect on plasma oxytocin, corticosterone, catecholamines and behavior. *Physiol Behav.* 1997; 61, 731–6.
- Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. *Zebrafish* as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci.* 2005; 86: 6-19.
- Hirsch D, Zukowska Z. NPY and stress 30 years later: the peripheral view. *Cell Mol. Neurobiol.* 2012; 32, 645-59.
- Hoyle CHV Purinergic cotransmission: parasympathetic and enteric nerves. *Semin Neurosci.* 1996 ; 8: 207–215.
- Hong M, Zheng J, Ding ZY, Chen JH, Yu L, Niu Y, Hua YQ, Wang LL. Imbalance between Th17 and Treg Cells May Play an Important Role in the Development of Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Depression in Mice. *Neuroimmunomodulation.* 2013; 20: 39-50.
- Horvat A, Stanojevic I, Drakulic D, Velickovic N, Petrovic S, Milosevic M. Effect of acute stress on NTPDase and 50-nucleotidase activities in brain synaptosomes in different stages of development. *Int. J. Devl Neuroscience.* 2010; 28:175–182.
- Ivanenkov VV, Meller J, Kirley TL. Characterization of disulfide bonds in human nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 (NTPDase3): implications for NTPDase structural modeling. *Biochemistry.* 2005; 44: 8998-9012.
- Karatsoreos IN, McEwen BS. Psychobiological allostasis: resistance, resilience and vulnerability. *Trends Cogn Sci.* 2011; 15: 576-84.
- Karten YJ, Nair SM, van Esssen L, Sibug R, Joëls M. Long-term exposure to high corticosterone levels attenuates serotonin responses in rat hippocampal CA1 neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999; 96: 13456-13461.
- Karst H, Joëls M. Brief RU 38486 treatment normalizes the effects of chronic stress on calcium currents in rat, hippocampal CA1 neurons. *Neuropsychopharmacology.* 2007; 32: 1830-1839.
- Kennedy C, Todorov LD, Mihaylova-Todorova S, Sneddon P. Release of soluble nucleotidases: a novel mechanism for neurotransmitter inactivation? *Trends Pharmacol Sci.* 1997; 18: 263-6.
- Khor YM, Soga T, Parhar IS. Caffeine neuroprotects against dexamethasone-induced anxiety-like behaviour in the *Zebrafish* (*Danio rerio*). *Gen Comp Endocrinol.* 2012; S16-6480: 390-5.

- Knowles AF. The GDA1\_CD39 superfamily: NTPDases with diverse functions. *Purinergic Signal*. 2011 ; 7 : 21-45.
- Kole MH, Swan L, Fuchs E. The antidepressant tianeptine persistently modulates glutamate receptor currents of the hippocampal CA3 commissural associational synapse in chronically stressed rat. *Eur J Neurosci*. 2002; 16: 807-816.
- Krügel U, Schraft T, Kittner H, Kiess W, Illes P. Basal and feeding-evoked dopamine release in the rat nucleus accumbens is depressed by leptin. *Eur J Pharmacol*. 2003; 482:185-7.
- 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.
- Kukulski F, Levesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Knowles AF, Robson SC, Kirley TL, Sévigny J. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal*. 2005; 1:193-204.
- Kunugi H, Hori H, Numakawa T, Ota M. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and depressive disorder: recent progress. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*. 2012; 32: 203-9.
- Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M: Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev*. 2009; 89:535-606.
- Kyrou I and Tsigos C. Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Current Opinion in Pharmacology*. 2009; 9: 787–793.
- Latini S, Pedata F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *J. Neurochem*. 2001; 79: 463-84.
- Lee AL, Ogle WO, Sapolsky RM. Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. *Bipolar Disord*. 2002; 4:117-128.
- Lee EW, Michalkiewicz M, Kitlinska J, Kalezic I, Switalska H, Yoo P, Sangkharat A, Ji H, Li L, Michalkiewicz T, Ljubisavljevic M, Johansson H, Grant DS, Zukowska Z. Neuropeptide Y induces ischemic angiogenesis and restores function of ischemic skeletal muscles. *J Clin Invest*. 2003; 111: 1853-1862.
- Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 11032-11037.
- Levin ED, Bencan Z, Cerutti DT. Anxiolytic effects of nicotine in *zebrafish*. *Physiol Behav*. 2007; 90:54–58.
- Levine S. Stress: an historical perspective. *Handbook of Stress and the Brain*. 2005; 15:3–23.
- Liu S, Leach SD. *Zebrafish* models for cancer. *Annu Rev Pathol*. 2011; 28:71-93.

- Liu Y, Jia G, Gou L, Sun L, Fu X, Lan N, Li S, Yin X. Antidepressant-like effects of tea polyphenols on mouse model of chronic unpredictable mild stress. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013; pii: S0091-3057.
- Löhr H, Hammerschmidt M. *Zebrafish* in Endocrine Systems: Recent Advances and Implications for Human Disease. *Annu Rev Physiol.* 2011; 73: 183-211.
- Magarinos AM, McEwen BS. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience.* 1995; 69: 83-88.
- Maier SA, Galeellis JR., McDermid HE. Phylogenetic analysis reveals a novel protein family closely related to adenosine deaminase. *J Mol Evol.* 2005; 61: 776-794.
- Martinez-Navio JM, Casanova V, Pacheco R, Naval-Macabuhay I, Climent N, Garcia F, Gatell JM, Mallol J, Gallart T, Lluís C, Franco R. Adenosine deaminase potentiates the generation of effector, memory, and regulatory CD4<sup>+</sup> T cells. *J Leukoc Biol.* 2011; 89:127-36.
- Maximino C, Lima MG, Olivera KR, Picanço-Diniz DL, Herculano AM. Adenosine A1, but not A2, receptor blockade increases anxiety and arousal in *Zebrafish*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011; 109: 203-7.
- McEwen B, Stellar E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med.* 1993; 153: 2093-2101.
- McEwen BS. Mood disorders and allostatic load. *Biol Psychiatry.* 2003; 54: 200-207.
- McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev.* 2007; 87:873-904.
- McEwen BS. Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J Pharmacol.* 2008; 583: 174-85.
- Miklósi A, Andrew RJ. The *Zebrafish* As A Model For Behavioral Studies. *Zebrafish.* 2006; 3:227-234.
- Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev Fish Biol Fish.* 1999; 9: 211-268.
- Monopoli A, Lozza G, Forlani A, Mattavelli A, Ongini E. Blockade of adenosine A2A receptors by SCH 58261 results in neuroprotective effects in cerebral ischaemia in rats. *NeuroReport.* 1998; 9 : 3955-3959.
- Oitzl MS, Champagne DL, van der Veen R, de Kloet ER.. Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neurosci Biobehav Rev.* 2010 ; 34: 853-866.
- Pankratov Y, Lalo U, Krishtal OA, Verkhratsky A. P2X receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience.* 2009; 158: 137-148.



- Panula P, Sallinen V, Sundvik M, Kolehmainen J, Torkko V, Tiittula A, Moshnyakov M, Podlasz P. Modulatory neurotransmitter systems and behavior: towards *zebrafish* models of neurodegenerative diseases. *Zebrafish*. 2006; 3: 235-47.
- Panula P, Chen YC, Priyadarshini M, Kudo H, Semenova S, Sundvik M, Sallinen V. The comparative neuroanatomy and neurochemistry of *zebrafish* CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiol Dis*. 2010; 40: 46-57.
- Piato AL, Capiotti KM, Tamborski AR, Oses JP, Barcellos LJ, Bogo MR, Lara DR, Vianna MR, Bonan CD. Unpredictable chronic stress model in *zebrafish* (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011a; 35: 561-7.
- Piato AL, Rosemberg DB, Capiotti KM, Siebel AM, Herrmann AP, Ghisleni G, Vianna MR, Bogo MR, Lara DR, Bonan CD. Acute Restraint Stress in *Zebrafish*: Behavioral Parameters and Purinergic Signaling. *Neurochem Res*. 2011b; 36: 1876-86.
- Purret SB. Quantitative aspects of stress-induced immunomodulation. *Int Immunol Pharmacol*. 2001; 1: 507-520.
- Rebola N, Pinheiro PC, Oliveira CR, Malva JO, Cunha RA. Subcellular localization of adenosine A1 receptors in nerve terminals and synapses of the rat hippocampus. *Brain Res*. 2003; 987:49-58.
- Rebola N, Canas PM, Oliveira CR, Cunha RA. Different synaptic and subsynaptic localization of adenosine A2A receptors in the hippocampus and striatum of the rat. *Neuroscience*. 2005; 132: 893-903.
- Ren H, Stiles GL. Dexamethasone stimulates human A1 adenosine receptor (A1AR) gene expression through multiple regulatory sites in promoter. *B Mol Pharmacol*. 1999; 55: 309-316.
- Ribeiro JA, Sebastião AM, de Mendonça A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog Neurobiol*. 2002; 68: 377-92.
- Ribeiro JA, Sebastiao AM, de Mendonca A. Participation of adenosine receptors in neuroprotection. *Drug News Perspect*. 2003; 16: 80-6.
- Ricatti MJ, Alfie LD, Lavoie EG, Sévigny J, Schwarzbaum PJ, Faillace MP. Immunocytochemical localization of NTPDases1 and 2 in the neural retina of mouse and *zebrafish*. *Synapse*. 2009; 63: 291-307.
- Rico EP, Senger MR, Fauth M da G, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of *zebrafish* (*Danio rerio*). *Life Sci*. 2003; 73: 2071-82.
- Rico EP, Rosemberg DB, Senger MR, Arizi M de B, Bernardi GF, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Methanol alters ecto-nucleotidases and acetylcholinesterase in *zebrafish* brain. *Neurotoxicol Teratol*. 2006; 28: 489-96.

- Rico EP, Rosemberg DB, Seibt KJ, Capiotti KM, Da Silva RS, Bonan CD. *Zebrafish* neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicol Teratol.* 2011 ; 33: 608-17.
- Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal.* 2006; 2: 409-430.
- Rodrigo R, Rivera G, Lucero Y, Larraguibel C. Effect of ethanol on regulation of (Na+K)-adenosine triphosphatase by aldosterone and dexamethasone in cultured renal papillary collecting duct cells. *Endocrine.* 2002; 19: 301-304.
- Roman V, Keijser JN, Luiten PG, Meerlo P. Repetitive stimulation of adenosine A1 receptors in vivo: changes in receptor numbers, G-proteins and A1 receptor agonist-induced hypothermia. *Brain Res.* 2008 ; 29 : 69-74.
- Rosemberg DB, Rico EP, Guidoti MR, Dias RD, Souza DO, Bonan CD, Bogo MR. Adenosine deaminase-related genes: molecular identification, tissue expression pattern and truncated alternative splice isoform in adult *zebrafish* (*Danio rerio*). *Life Sci.* 2007; 81: 1526-34.
- Rosemberg DB, Rico EP, Senger MR, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD, Souza DO. Kinetic characterization of adenosine deaminase activity in *zebrafish* (*Danio rerio*) brain. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2008; 151: 96-101.
- Rosemberg DB, Rico EP, Langoni AS, Spinelli JT, Pereira TC, Dias RD, Souza OD, Bonan CD, Bogo MR. NTPDase family in *zebrafish*: Nucleotide hydrolysis, molecular identification and gene expression profiles in brain, liver and heart. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2010; 155: 230-240.
- Roy MP, Kirschbaum C, Steptoe A. Psychological cardiovascular and metabolic correlates of individual differences in stress recovery in young men. *Psychoneuroendocrinology.* 2001; 26: 375-391.
- Rubinstein AL. *Zebrafish*: from disease modelling to drug discovery. *Cur Opin Drug Discov Devel.* 2003; 6: 218-223.
- Ruys JD, Mendoza SP, Capitanio JP, Mason WA. Behavioral and physiological adaptation to repeated chair restraint in rhesus macaques. *Physiol Behav.* 2004; 82: 205-213.
- Scaccianoce S, Navarra D, Di Sciuillo A, Angelucci L, Endroczi E. Adenosine and pituitary-adrenocortical axis activity in the rat. *Neuroendocrinology.* 1989; 50: 464-468.
- Selye H. Syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature.* 1936; 138: 32.
- Selye H. Stress without distress. *Brux Med.* 1976; 56: 205-10.
- Senger MR, Rico EP, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Ecto-5'-nucleotidase activity in brain membranes of *zebrafish* (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2004; 139: 203-7.

- Smirnov I, Walsh JT, Kipnis J. Chronic mild stress eliminates the neuroprotective effect of Copaxone after CNS injury. *Brain Behav Immun.* 2013; pii: S0889-1591.
- Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev.* 2005; 4: 141-194.
- Szabo S, Tache Y, Somogyi A. The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: a retrospective 75 years after his landmark brief "letter" to the editor# of nature. *Stress.* 2012; 15: 472-8.
- Szabó N, Kincses ZT, Vécsei L. Novel therapy in Parkinson's disease: adenosine A(2A) receptor antagonists. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2011; 7: 441-55.
- Tabarin A, Diz-Chaves Y, Consoli D, Monsaingeon M, Bale TL, Culler MD. Role of the corticotrophin-releasing factor receptor type 2 in the control of food intake in mice: a meal pattern analysis. *Eur J Neurosci.* 2007; 26: 2303-2314.
- Torres ILS, Gamaro GD, Silveira-Cucco SN, Michalowski MB, Corrêa JB, Perry MLS, Dalmaz C. Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO<sub>2</sub> in hippocampal and cerebral cortex slices. *Bras. J. Med. Biol.* 2001; 34: 111-6.
- Torres IL, Buffon A, Silveira PP, Duarte MZ, Bassani MG, Oliveira SS, Battastini AM, Sarkis JJ, Dalmaz C, Ferreira MB. Effect of chronic and acute stress on ectonucleotidase activities in spinal cord. *Physiol Behav.* 2002a; 75:1-5.
- Torres IL, Buffon A, Dantas G, Furstenau CR, Bohmer AE, Battastini AM, Sarkis JJ, Dalmaz C, Ferreira MB. Chronic stress effects on adenine nucleotide hydrolysis in the blood serum and brain structures of rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002b; 74: 181-6.
- Torres IL, Battastini AM, Buffon A, Fürstenau CR, Siqueira I, Sarkis JJ, Dalmaz C, Ferreira MB. Ecto-nucleotidase activities in spinal cord of rats changes as function of age. *Int J Dev Neurosci.* 2003; 21: 425-9.
- Tu J, Wang LP. Therapeutic potential of extracellular ATP and P2 receptors in nervous system diseases. *Neurosci Bull.* 2009; 25: 27-32.
- Valadas JS, Batalha VL, Ferreira DG, Gomes R, Coelho JE, Sebastião AM, Diógenes MJ, Lopes LV. Neuroprotection afforded by adenosine A(2A) receptor blockade is modulated by corticotrophin-releasing factor (CRH) in glutamate injured cortical neurons. *J Neurochem.* 2012, 123: 1030-40.
- Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell G. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2X receptor for extra-cellular ATP. *Nature.* 1994; 371: 516-519.
- Wu LM, Hu MH, Tong XH, Han H, Shen N, Jin RT, Wang W, Zhou GX, He GP, Liu YS. Chronic unpredictable stress decreases expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in mouse ovaries: relationship to oocytes developmental potential. *PLoS One.* 2012; 7:e52331.

- Wu G, Feder A, Cohen H, Kim JJ, Calderon S, Charney DS, Mathé AA. Understanding resilience. *Front Behav Neurosci*. 2013; 7-10.
- Xia S, Zhu Y, Xu X, Xia W. Computational techniques in *zebrafish* image processing and analysis. *J Neurosci Methods*. 2012; S0165-0270: 00465-7.
- Xin SC, Zhao YQ, Li S, Lin S, Zhong HB. Application of *zebrafish* models in drug screening. *Yi Chuan*. 2012; 34: 1144-52.
- Yadin E, Thomas E. Stimulation of the lateral septum attenuates immobilization-induced stress ulcers. *Physiol Behav*. 1993; 59: 883–886.
- Yalcin I, Belzung C, Surget A. Mouse strain differences in the unpredictable chronic mild stress: a four-antidepressant survey. *Behav Brain Res*. 2008; 19: 140-3.
- Yang L, Ho NY, Alshut R, Legradi J, Weiss C, Reischl M, Mikut R, Liebel U, Müller F, Strähle U. *Zebrafish* embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reprod Toxicol*. 2009; 2: 245-53.
- Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1783: 673-694.
- Zavialov AV, Engstrom A. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. *Biochem J*. 2005; 391: 51-57.
- Zimmermann, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs 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: 1-5.