

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA  
FARMACOLOGIA APLICADA A PRODUÇÃO ANIMAL**

**Renan Idalencio**

**ENVOLVIMENTO DOPAMINÉRGICO NA MODULAÇÃO DA  
RESPOSTA DE ESTRESSE EM PEIXES-ZEBRA (*Danio rerio*).**

Santa Maria, 2019  
RS

**Renan Idalencio**

**ENVOLVIMENTO DOPAMINÉRGICO NA MODULAÇÃO DA  
RESPOSTA DE ESTRESSE EM PEIXES-ZEBRA (*Danio rerio*).**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia Aplicada à Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) como requisito parcial para a obtenção de título de **Doutor em Farmacologia**.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos  
Co-orientador: Prof. Dr. Caio Maximino de Oliveira

Santa Maria, 2019  
RS

Idalencio, Renan  
ENVOLVIMENTO DOPAMINÉRGICO NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA DE  
ESTRESSE EM PEIXES-ZEBRA (Danio rerio) / Renan  
Idalencio.- 2019.  
72 p.; 30 cm

Orientador: Leonardo José Gil Barcellos  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia, RS, 2019

1. Zebrafish 2. Levodopa 3. Controle dopaminérgico 4.  
Estresse 5. AMPT I. José Gil Barcellos, Leonardo II.  
Título.

**Renan Idalencio**

**ENVOLVIMENTO DOPAMINÉRGICO NA MODULAÇÃO DA  
RESPOSTA DE ESTRESSE EM PEIXES-ZEBRA (*Danio rerio*).**

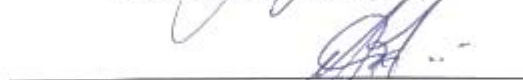
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia Aplicada à Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) como requisito parcial para a obtenção de título de **Doutor em Farmacologia**.

Aprovado em 03 de junho de 2019:

  
Dr. Leonardo José Gil Barcellos (UPF)  
(Presidente/Orientador)

  
Dra. Anna Maria Siebel (UNOCHAPECÓ)

  
Dra. Lúiz Carlos Kreutz (UPF)

  
Dr. Mauro Alves da Cunha (UFSM)

  
Dr. Denis Broock Rosemberg (UFSM)

Santa Maria, 2019  
RS

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus familiares, que estiveram ao meu lado durante toda esta etapa e não mediram esforços para me apoiar, confortar, respeitar, auxiliar, criticar ou aceitar!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador Leonardo Barcellos pela oportunidade de convivência durante pelo menos 11 anos, desde o início da graduação até o mestrado e doutorado. Convivência esta que me proporcionou amadurecimento profissional e pessoal e intimidade suficiente para chama-lo, além de Professor/Orientador, de AMIGO!

Agradeço aos colegas do Laboratório de Fisiologia de Peixes da Universidade de Passo Fundo pelo acolhimento, ensinamento, amizades e tanto extrato de cortisol.

Por fim agradeço meus familiares por acreditarem em meu potencial, investirem em minha formação acadêmica e profissional e apoiarem todas minhas escolhas e decisões!

“O dinheiro faz homens ricos, o conhecimento faz homens sábios e a humildade faz grandes homens”.

Mahatma Gandhi

## RESUMO

# ENVOLVIMENTO DOPAMINÉRGICO NA MODULAÇÃO DA RESPOSTA DE ESTRESSE EM PEIXES-ZEBRA (*Danio rerio*).

Autor: Renan Idalencio

Orientador: Leonardo José Gil Barcellos

O sistema dopaminérgico é alvo de inúmeras pesquisas devido sua complexidade e por possuir numerosas vias e receptores no sistema nervoso central. A liberação de catecolaminas como a dopamina e norepinefrina, são dependentes da presença de tirosina hidroxilase, que converte a L-tirosina em L-DOPA/levodopa e posteriormente em dopamina pela dopa descarboxilase. Por fim a dopamina é convertida em norepinefrina pela dopamina  $\beta$ -hidroxilase. Por outro lado, análogos da L-tirosina como a *a*-metil-*para*-tirosina, são potentes inibidores competitivos da tirosina hidroxilase, inibindo a produção de catecolaminas. Cabe ressaltar que a dopamina é responsável por inúmeras funções como locomoção, cognição, emoção e funções neuroendócrinas. Neste contexto, nosso objetivo foi investigar a participação da via dopaminérgica sobre o eixo neuroendócrino de estresse em peixe-zebra. Nós mostramos, com base nos resultados dos dois artigos descritos que existe uma íntima relação entre catecolaminas e glicocorticoides nas respostas neuroendócrinas de estresse. No primeiro artigo, mostramos que a *a*-metil-*para*-tirosina foi capaz de bloquear o eixo de estresse em peixe-zebra adulto após um evento estressor. E no segundo artigo após bloqueio da via dopaminérgica com *a*-metil-*para*-tirosina e posterior suplementação com levodopa, sugerimos fortes indícios de que a dopamina está relacionada ao equilíbrio da resposta ao estresse e a norepinefrina a diminuição desta resposta.

**Palavras-chave:** Cortisol. Eixo hipotálamo-hipófise-interrenal. Controle dopaminérgico. AMPT. Resposta de estresse. Levodopa.



## ABSTRACT

### DOPAMINERGIC INVOLVEMENT IN THE MODULATION OF THE STRESS RESPONSE IN ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Author: Renan Idalencio

Advisor: Leonardo José Gil Barcellos

The dopaminergic system is the subject of numerous researches due to its complexity and to have numerous pathways and receptors in the central nervous system. The release of catecholamines such as dopamine and norepinephrine, are dependent on the presence of tyrosine hydroxylase, which converts L-tyrosine to L-DOPA / levodopa and later into dopamine by dopa decarboxylase. Finally, dopamine is converted to norepinephrine by dopamine  $\beta$ -hydroxylase. On the other hand, L-tyrosine analogues such as *a*-methyl-*para*-tyrosine are potent competitive inhibitors of tyrosine hydroxylase, inhibiting the production of catecholamines. It should be noted that dopamine is responsible for innumerable functions such as locomotion, cognition, emotion and neuroendocrine functions. In this context, our objective was to investigate the participation of the dopaminergic pathway on the neuroendocrine axis of stress in zebrafish. We have shown, based on the results of the two articles described, that there is an intimate relationship between catecholamine's and glucocorticoids in neuroendocrine stress responses. In the first article, we showed that *a*-methyl-*para*-tyrosine was able to block the stress axis in adult zebrafish after a stressor event. And in the second article after blocking the dopaminergic pathway with *a*-methyl-*para*-tyrosine and subsequent levodopa supplementation, we strongly suggest that dopamine is related to the balance of stress response and norepinephrine to decrease this response.

**Key-words:** Cortisol. Hypothalamus-pituitary-interrenal axis. Dopaminergic control. AMPT. Stress response. Levodopa.

## LISTA DE FIGURAS

### Apresentação:

- Figura 1.** Eixo hipotálamo-pituitária-interrenal em peixes \_\_\_\_\_ 15
- Figura 2.** Zebrafish (*Danio rerio*) \_\_\_\_\_ 17
- Figura 3. A** – Árvore filogenética de TH de diferentes classes de cordados (mamíferos, aves, anfíbios e peixes teleósteos). **B** – Desenho esquemático da população de células dopaminérgicas em corte sagital do cérebro de peixe-zebra. Área azul com células expressando TH1, vermelha TH2 e púrpura TH1 e TH2. \_\_\_\_\_ 21
- Figura 4.** Sinapse dopaminérgica \_\_\_\_\_ 22
- Figura 5.** Quadro evolutivo dos genes de receptores de dopamina nos vertebrados. Setas indicando as duplicações do genoma, e a ponta da seta indica uma duplicação de genes. Um único gene D1 e D2 nos cordados foram provavelmente duplicada duas vezes, antes e depois da separação ciclostomes-gnastostomados. \_\_\_\_\_ 23
- Figura 6.** Fórmula estrutural do AMPT \_\_\_\_\_ 28
- Figura 7.** Fórmula estrutural da levodopa \_\_\_\_\_ 29
- Figura 8.** Esquema de publicações como autor principal e co-autor, juntamente ao grupo de pesquisa do laboratório de Fisiologia de peixes – UPF, do período de Agosto de 2015 a Abril de 2019. \_\_\_\_\_ 59

### Artigo 1

- Fig. 1.** Cortisol levels in fish exposed or not to AMPT treatment. Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean. Data were compared by a three-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparisons test. \*P < 0.05 vs. all other groups; #P < 0.05 vs. AMPT 25 S- (n = 6 in all sample points). \_\_ 33

### Artigo 2

- Figure 1.** Concentration of cortisol in zebrafish exposed to levodopa/carbidopa treatment or to the control treatment (Levo 0 mM). A – Cortisol response at 15 min after the acute stress test. B - Cortisol response at 60 min after the acute stress test. C – Cortisol response at 240 min after the acute stress test. Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean. The data were compared by means of one-way analysis of variance (ANOVA) at different times (15, 60, and 240 min) followed by Tukey's multiple comparison test. \_\_\_\_\_ 43

**Figure 2.** Concentration of cortisol in zebrafish exposed to AMPT + levodopa/carbidopa treatment or to control treatment (Levo 0 mM + AMPT 0  $\mu$ M). A – Cortisol response at 15 min after the acute stress test. B - Cortisol response at 60 min after the acute stress test. C - Cortisol response at 60 min after the acute stress test. The data are expressed as the median  $\pm$  interquartile range. The data were compared using a Kruskal-Wallis analysis at different times (15, 60, and 240 min) followed by a multiple comparison test. \_\_\_\_\_ 45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AMPT	<i>a</i> -metil- <i>para</i> -tirosina
AP-1	Proteína ativadora 1
AVP	Vasopressina
CAs	Catecolaminas
COMT	Catecol-O-metil-transferase
CSF	Líquido Cefalorraquidiano de Contato
DA	Dopamina
DBC	Dopamina $\beta$ -hidroxilase
DDC	Dopa Descarboxilase
DOPAL	3,4-dihidroxifenilacetaldeído
GPCR	Receptores Associados a Proteína G de membrana
GRs	Receptores de Glicocorticóides
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
HPI	Hipotálamo-pituitária-interrenal
MAO	Monoamina oxidase
MRs	Receptores de Mineralocorticóides
NE	Norepinefrina
PAH	Fenilalanina hidroxilase
PNMT	Feniletanolamina-N-metil-transferase
SNC	Sistema Nervoso Central
TH	Tirosina Hidroxilase
TH-ir	Tirosina Hidroxilase Imunorreativas
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	15
2.1 ESTRESSE	15
2.1.1 Eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HPI)	15
2.1.2 O peixe-zebra e suas respostas neuroendócrinas de estresse	17
2.2 CONTROLE DOPAMINÉRGICO DA RESPOSTA DE ESTRESSE	19
2.2.1 Neuroquímica do sistema dopaminérgico	19
2.2.2 Receptores dopaminérgicos	23
2.2.3 Organização anatômica do sistema dopaminérgico no peixe-zebra	24
2.2.4 Controle do sistema dopaminérgico sobre o estresse	26
2.3 <i>a</i> -metil- <i>para</i> -tirosina (AMPT)	27
2.4 LEVODOPA / L-DOPA	28
<b>3 OBJETIVOS</b>	30
3.1 OBJETIVO GERAL	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
<b>4 ARTIGOS</b>	31
<b>5 DISCUSSÃO</b>	54
<b>6 CONCLUSÃO</b>	57
<b>7 PERSPECTIVAS</b>	58
<b>8 DEMAIS PUBLICAÇÕES</b>	59
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	65
<b>10 ANEXO</b>	73

## 1 INTRODUÇÃO

O estresse caracteriza-se por alterações fisiológicas, comportamentais e bioquímicas em consequência à ameaça da homeostase do organismo (CHROUSOS e GOLD, 1992), sendo o cortisol o indicador mais utilizado para avaliar estresse agudo em peixes (BONGA, 1997). Qualquer prejuízo na capacidade de elevar o cortisol plasmático em resposta a ameaças tornam o animal fisiologicamente comprometido, impedindo que o mesmo responda aos estressores de forma adequada. Este déficit de resposta ao estresse torna o animal mais suscetível, e em nível populacional pode interferir na taxa de sobrevivência (BONGA, 1997; PACHECO & SANTOS, 2001).

As alterações nos níveis de cortisol parecem estar ligadas aos níveis de dopamina (DA) em diversas espécies (HONTELA, 1998; PIAZZA et al., 1996; ENRICO et al., 1998), com evidência de inervação direta catecolaminérgica e serotoninérgica nos neurônios produtores de Hormônio Liberador de Corticotrofina (CRH, *corticotrophin releasing hormone*) no hipotálamo, e esses e outros neurotransmissores parecem influenciar a liberação de CRH (NAKAMURA et al., 1992). A DA é um neurotransmissor predominante no cérebro dos vertebrados, com funções que incluem locomoção, cognição, emoção e secreções neuroendócrinas (OWEN et al., 1978; MISSALE et al., 1998). A síntese da DA ocorre pela presença da L-tirosina, que é metabolizada através da tirosina hidroxilase (TH) nos terminais nervosos dopaminérgicos. A TH realiza a conversão de L-tirosina em L-DOPA (EMILIEN et al., 1999; COOPER et al., 1996; FREUND et al., 1984), sendo a TH ponto de regulação da DA (YAMAMOTO & VERNIER, 2011; NAGATSU et al., 1964). A L-DOPA é convertida em DA pela enzima dopa descarboxilase (DDC), esta abundante em neurônios catecolaminérgicos (LEVITT et al., 1965). Por outro lado, análogos da L-tirosina como *α*-metil-*para*-tirosina (AMPT) são potentes inibidores competitivo da TH (BEAR et al., 2002).

Assim, nosso objetivo geral foi de contribuir para o esclarecimento do papel da via dopaminérgica sobre o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HPI) com a hipótese de que o bloqueio ou estimulação da via dopaminérgica com antagonistas, inibidores competitivos ou agonistas, podem afetar o correto funcionamento do eixo neuroendócrino de estresse, prejudicando a homeostasia dos peixes. O peixe-zebra (*Danio rerio*) será utilizado como organismo de estudo, uma vez que esta espécie apresenta inúmeras vantagens, tais como a

facilidade de agrupamento e manutenção, bem como elevada homologia com os seres humanos (WEINER & MOLINOFF, 1989; BARBAZUK et al., 2000; GOLDSMITH, 2004). Estudos recentes têm reforçado a sua utilização como um organismo modelo para o estudo do estresse (GOLDSMITH, 2004; EGAN et al., 2009; CACHAT et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2013; BARCELLOS et al., 2007; BARCELLOS et al., 2010; PIATO et al., 2011).

Na presente tese serão abordadas as seguintes seções: revisão bibliográfica, objetivos, 2 artigos, discussão, conclusão, perspectivas futuras, demais publicações e referências bibliográficas. O artigo 1 foi publicado na revista *General and Comparative Endocrinology* intitulado “ *$\alpha$ -methyltyrosine, a tyrosine hydroxylase inhibitor, decreases stress response in zebrafish (*Danio rerio*)*” e artigo 2 submetido à mesma revista, intitulado “Effect of levodopa on stress response in zebrafish”.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

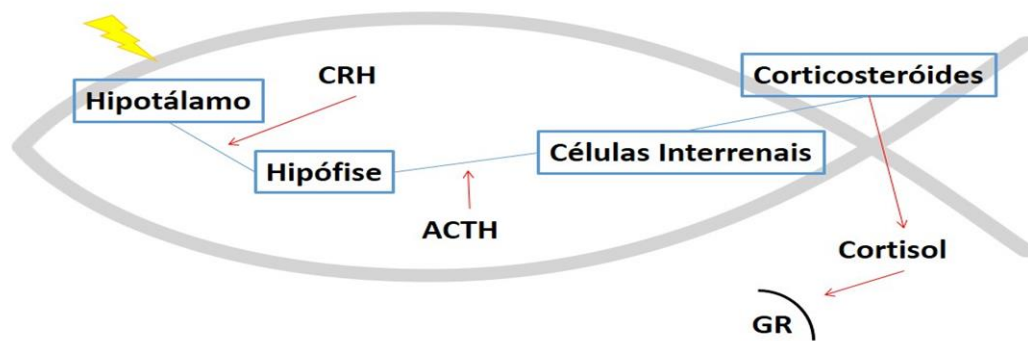
### 2.1 ESTRESSE

#### 2.1.1 Eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HPI)

O estresse caracteriza-se por alterações fisiológicas, comportamentais e bioquímicas em consequência a ameaça da homeostase do organismo, frente à ação de estímulos intrínsecos denominados estressores, sendo a hipersecreção de cortisol uma das primeiras alterações observadas (CHROUSOS & GOLD, 1992).

A partir do momento em que o alvo é estimulado pelo estressor, seu eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HPI) é ativado pela secreção de CRH e vasopressina (AVP) pelo hipotálamo, que por sua vez ativam a hipófise a secretar o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), e este por fim, estimula a secreção de glicocorticoides pelo córtex adrenal em mamíferos ou células interrenais em peixes conforme (Figura 1) (PARIANTE & MILLER, 2001).

**Figura 1.** Eixo hipotálamo-pituitária-interrenal em peixes.



**Fonte:** Próprio autor.

Os glicocorticoides possuem importante papel nos processos homeostáticos como crescimento, metabolismo, reprodução e função imune, sendo que qualquer impacto no seu



eixo neuroendócrino de controle pode potencialmente afetar o animal (PACHECO & SANTOS, 2001).

Essas respostas são mediadas pela ativação de receptores nucleares por glicocorticoides, pequenas moléculas lipossolúveis que se difundem através das membranas celulares e se ligam aos receptores que estão localizados no citoplasma, receptores de glicocorticoides (GRs) e receptores de mineralocorticoides. Em resposta ao acoplamento ao ligante, os receptores translocam-se para o núcleo, onde regulam a expressão de certos genes por meio da ligação a elementos de resposta hormonal específicos. No eixo HPA, esse processo é responsável pela inibição negativa por retroalimentação da secreção do ACTH pela pituitária e do CRH a partir do hipotálamo (PARIANTE & MILLER, 2001).

Os glicocorticoides regulam funções de quase todos os tecidos do corpo, porém o efeito fisiológico mais conhecido desses hormônios é o metabolismo energético (PARIANTE & MILLER, 2001).

Os corticosteroides possuem importante papel nos processos homeostáticos como crescimento, metabolismo, reprodução e função imune, sendo que qualquer impacto no seu eixo neuroendócrino de controle pode potencialmente afetar o animal, e devido a esta grande importância fisiológica, alterações neste eixo são consideradas importantes biomarcadores de poluição ambiental (PACHECO & SANTOS, 2001).

Quando não há ligação com dos glicocorticoides aos GRs, estes ativam a proteína ativadora-1 (AP-1), fator de transcrição composto por dímeros da família de proteínas Jun e Fos, levando à inibição da transcrição de vários genes envolvidos nas respostas imune e/ou inflamatória como elastase, colagenase, ativador de plasminogênio, fofolipase A-2, citocinas, sintetase do óxido nítrico e ciclooxigenase. Níveis baixos dos glicocorticóides, ocorre uma dissociação rápida destes com os receptores intranucleares, com parada da resposta transcricional (BAMBERGER et al., 1996; BAXTER, 1992).

Assim, o estresse deve ser caracterizado em três respostas: a primária, que compreende a liberação massiva de catecolaminas e corticosteroides; a secundária, em que ocorre a canalização das ações e dos efeitos desses hormônios no sangue e tecidos, e a terciária, em nível populacional, refletindo em crescimento, reprodução e resposta imune (BARTON, 2002).

Se a resposta ao estresse gerar ativação fisiológica frequente, duradoura ou intensa,

pode precipitar um esgotamento dos recursos com aparecimento de transtornos psicofisiológicos diversos, podendo predispor ao aparecimento de transtornos de ansiedade (MARGIS et al., 2003). Dentre as diversas respostas secundárias a estressores, observa-se de forma proeminente ajustes defensivos que produzem sensações, em seres humanos, de ansiedade. A ansiedade pode ser definida como comportamento frente a uma ameaça em potencial, incluindo a relação com um predador, estímulos aversivos no ambiente, ou ainda um novo ambiente (BLANCHARD & BLANCHARD, 1988; GRAEFF, 2007).

### 2.1.2 O peixe-zebra e suas respostas neuroendócrinas de estresse

O *Danio rerio* conhecido popularmente no Brasil como *zebrafish*, peixe zebra ou paulistinha (Figura 2), pertence à família *Cyprinidae* e é um pequeno peixe teleósteo (3- 4 cm), de água doce, caracterizado por um padrão de coloração baseado em listras horizontais, claras e escuras. Vem sendo utilizado, nos últimos anos, como modelo experimental para o estudo de numerosas doenças humanas, toxicologia, pesquisas transgênicas, evolução do genoma vertebrado, teratologia (YANG et al., 2009), mutagênese, neurociências (BECKER & BECKER, 2008) e estudos farmacológicos e comportamentais (SPENCE et al., 2008).

**Figura 2.** Zebrafish (*Danio rerio*).



**Fonte:** Philippe Mourrain, 2007.

O peixe-zebra é o modelo animal vertebrado ideal, devido às várias características como rápido desenvolvimento, facilidade de agrupamento dos exemplares, disponibilidade de aquisição e aplicabilidade, sendo sua manutenção de baixo custo se comparado a modelos experimentais tradicionais, como roedores. A transparência óptica durante a embriogênese do peixe-zebra facilita a detecção de anormalidades morfológicas,

além de já se saber seu sequenciamento genético e possuir homólogos em mamíferos humanos e roedores, o que propicia um leque de possibilidades para as pesquisas dos fenótipos produzidos por determinadas mutações (DAHM & GEISLER, 2006).

Devido ao fato do peixe-zebra atingir a maturidade sexual muito precocemente (geralmente aos três meses de idade), reproduzir-se durante o ano inteiro e possuir características morfológicas e fisiológicas conhecidas, esta espécie desperta interesse em pesquisas para acelerar o processo de descoberta e reposicionamento de drogas, bem como estudar mecanismos de ação dos fármacos sobre aspectos fisiológicos e comportamentais (KABASCHI et al., 2011, KHAN et al., 2017).

Em peixes-zebra, a resposta ao estresse – incluindo respostas comportamentais, como estratégias defensivas tipo-ansiedade – apresenta similaridades fisiológicas e funcionais aos dos vertebrados terrestres, e envolve a estimulação de consumo e transferências de oxigênio, mobilização de substratos energéticos, diminuição do uso de energia e efeitos supressivos de funções imunes (BONGA, 1997).

Assim como em humanos, o cortisol é o produto final do eixo neuroendócrino do estresse (BARTON & IWAMA, 1991; BONGA, 1997; MOMMSEN et al., 1999; BARCELLOS et al., 2007), o que torna o peixe-zebra um modelo translacional apropriado para o estudo de estresse em humanos.

De acordo com BONGA (1997), o cortisol é o indicador mais utilizado para avaliar estresse agudo em peixes. A elevação do cortisol ocorre quando o contato com o agente agressor acontece, podendo ser considerado como uma situação de estresse que, além das alterações comportamentais, pode induzir respostas fisiológicas secundárias ao estresse. Essa ativação pode ocorrer a partir do contato direto com o agressor, seja ele uma alteração química na água pela redução de oxigênio, contaminação ou física como alta densidade populacional (MARIANO et al., 2009).

Alterações na responsividade a estressores – ou seja, prejuízo na capacidade de elevar o cortisol plasmático em resposta a ameaças ambientais significativas – tornam o animal, fisiologicamente comprometido, não respondendo aos estressores comuns de forma adequada. Este déficit de resposta ao estresse torna o animal mais susceptível, e em nível populacional pode interferir na taxa de sobrevivência (PACHECO & SANTOS, 2001; HONTELA, 1998).

A elevação dos níveis de cortisol pode ser bloqueada ou diminuída por ação de tóxicos que prejudicam a capacidade do tecido interrenal de sintetizar cortisol, ou que afetam outros pontos do eixo HPI, deixando o tecido interrenal sem o estímulo necessário para síntese deste hormônio (ALURU e VIJAYAN, 2006).

Estudos observaram que fármacos psicoativos podem atuar tanto em SNC como em células interrenais no que diz respeito ao bloqueio da resposta ao estresse. O diazepam e a fluoxetina atuando no SNC por GABA e via serotoninérgica e/ou células interrenais, respectivamente (ABREU et al., 2014), o álcool através de GABA em SNC (OLIVEIRA et al., 2013) e a risperidona (IDALENCIO et al., 20015) e o aripiprazol (BARCELLOS et al., 2016) através da via dopaminérgica e/ou serotoninérgica em SNC.

## 2.2 CONTROLE DOPAMINÉRGICO DA RESPOSTA DE ESTRESSE

### 2.2.1 Neuroquímica do sistema dopaminérgico

A dopamina (DA) é um neurotransmissor predominante no cérebro dos vertebrados, com funções que incluem locomoção, cognição, emoção e secreção neuroendócrinas (MISSALE et al., 1998; EMILIEN et al., 1999). No SNC, está presente em quatro vias principais, sendo cada via relacionada a um distúrbio: nigroestriatal (Parkinson); mesocortical (hiperatividade e déficit de atenção); mesolímbica (respostas emocionais, esquizofrenia) e túbero-infundibular (via curta relacionada a liberação de hormônios da hipófise) (LANDBERG & JAMES, 1998).

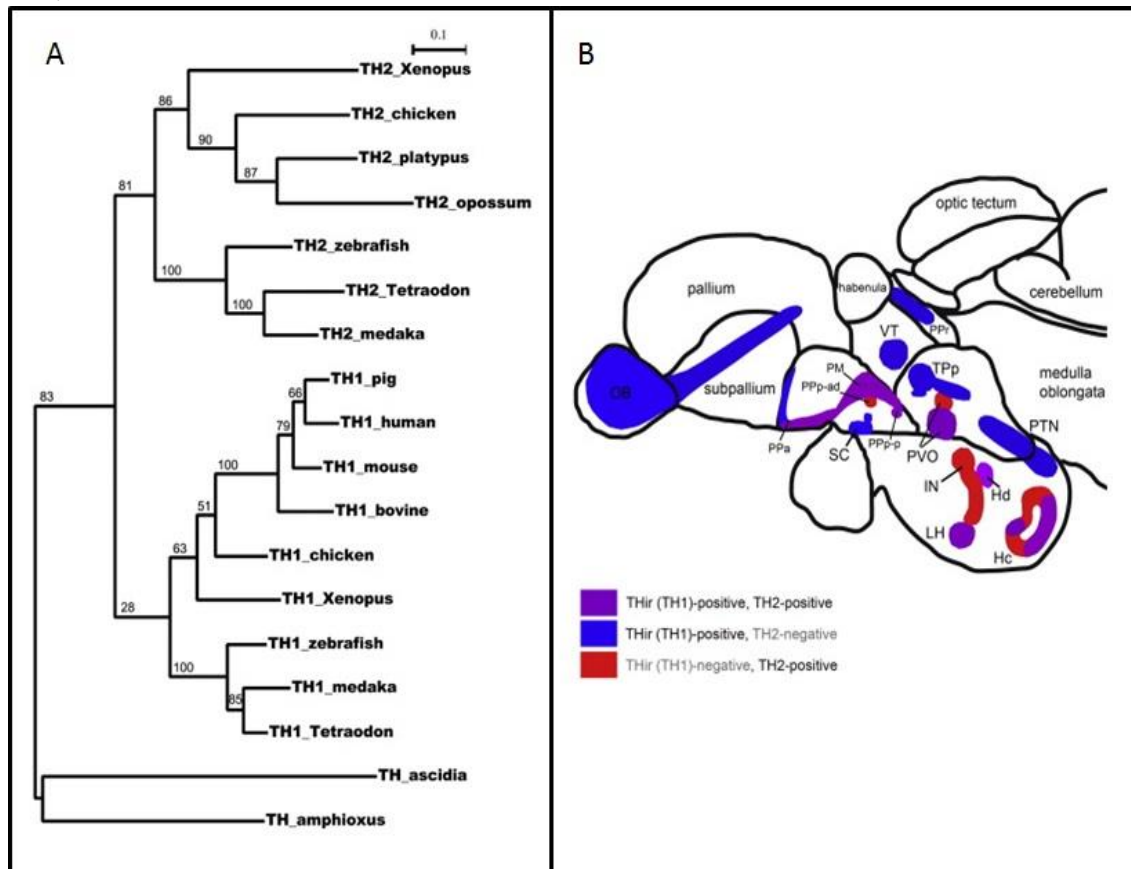
A síntese deste neurotransmissor ocorre pela presença do aminoácido aromático L-tirosina, que é metabolizado através da tirosina hidroxilase (TH) nos terminais nervosos dopaminérgicos. Como a tirosina não é abundantemente ofertada, a fenilalanina, outro aminoácido aromático da família presente nos alimentos, é degradada pela fenilalanina hidroxilase (PAH) em L-tirosina. A TH realiza a conversão de L-tirosina para L-DOPA (di-hidroxfenilalanina) (COOPER et al., 1996; FREUND et al., 1984; YAMAMOTO & VERNIER, 2011). A L-DOPA é convertida em DA pela enzima dopa descarboxilase (DDC), esta abundante em neurônios catecolaminérgicos (BEAR et al., 2002). A hidroxilação de L-tirosina é o ponto de regulação e síntese de catecolaminas no SNC, e desta forma a TH é a

enzima que limita a síntese de DA, noradrenalina e adrenalina (NAGATSU, 1964; LEVITT, 1965). Por outro lado, análogos da L-tirosina como *a*-metil-*para*-tirosina (AMPT), são potentes inibidores competitivo da TH, agindo como substratos falsos (WEINER & MOLINOFF, 1989).

Em protestômicos e deuterostômicos o gene TH é homólogo, sugerindo que os dois partilham de um TH gene ancestral comum. Em vertebrados mandibulados dois genes TH (TH1 e TH2) foram demonstrados, com exceção de mamíferos placentários. Análises filogenéticas sugerem que os dois genes TH foram duplicados antes da divergência dos vertebrados mandibulados e se perdeu na linhagem placentária. O momento exato da duplicação não pode ser esclarecido enquanto o genoma da lampréia seja explorado, mas sugere-se que o gene TH desta seja um TH1 de vertebrados com mandíbula, e que desta forma a duplicação ocorreu de fato antes da separação de gnastotomados e agnatas (YAMAMOTO & VERNIER, 2011).

Através de sequenciamento genômico (figura 3-A), foi possível detectar dois genes TH no genoma do peixe-zebra, um localizado no cromossomo 25 e ortólogos para o gene TH1 de perca-gigante (barramundi) e o outro localizado no cromossomo 4 também ortólogos ao gene TH2. A localização das células com expressão para TH1 e TH2 foi estabelecida em cérebro de peixe-zebra adulto (figura 3-B). Neurônios expressando TH1 foram amplamente distribuídos a partir da região rostral para caudal incluindo o bulbo olfativo, telencéfalo, área pré-óptica, região ventral do tálamo, mesencéfalo, tubérculo posterior, hipotálamo e cérebro posterior. Células expressando TH2 estavam ausentes no bulbo olfativo e telencéfalo, bem como na parte posterior do cérebro. A localização de TH2 foi restrita a células periventriculares no diencéfalo (área pré-óptica, tubérculo posterior e hipotálamo) (YAMAMOTO et al., 2010).

**Figura 3. A** – Árvore filogenética de TH de diferentes classes de cordados (mamíferos, aves, anfíbios e peixes teleósteos). **B** – Desenho esquemático da população de células dopaminérgicas em corte sagital do cérebro de peixe-zebra. Área azul com células expressando TH1, vermelha TH2 e púrpura TH1 e TH2.

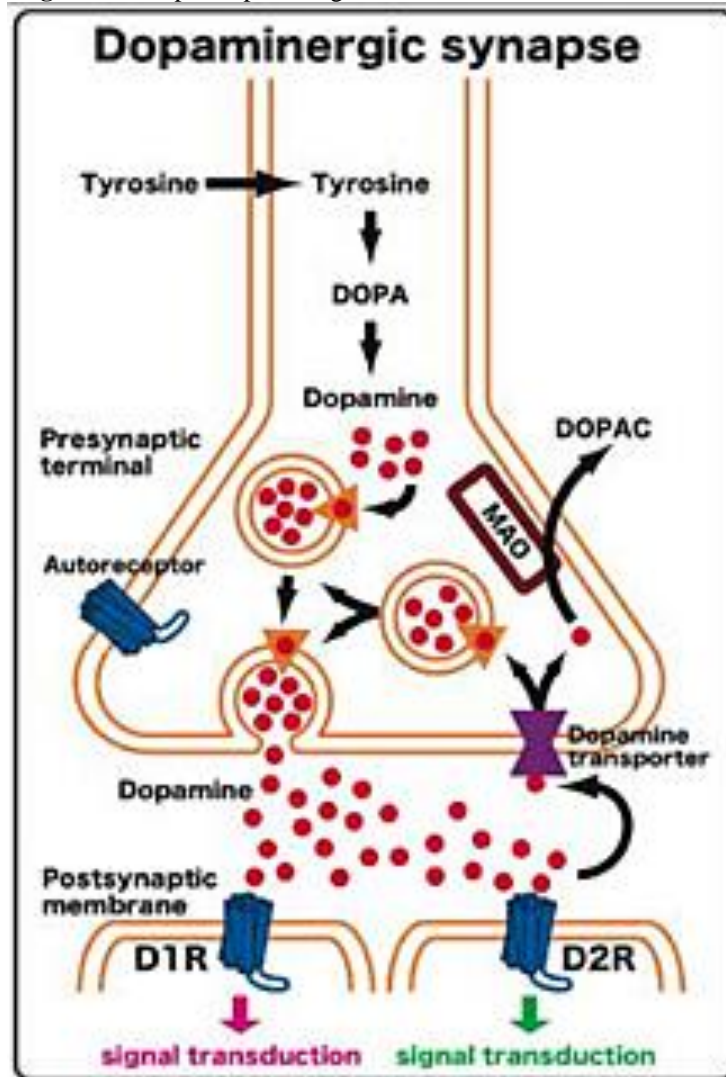


Fonte: Adaptado de Yamamoto *et. al.*, 2010

A DA é também um precursor de outras duas catecolaminas: noradrenalina, produzida através da ação da enzima dopamina/tiramina  $\beta$ -hidroxilase (DBH); e adrenalina, catalisada por feniletanolamina-N-metil-transferase (PNMT) (YAMAMOTO & VERNIER, 2011).

A DA é armazenada em vesículas sinápticas, e sua entrada depende do gradiente de pH na membrana da vesícula. A despolarização da membrana permite o influxo de cálcio, este desempenhando papel inicial na exocitose, ocorrendo liberação da dopamina na fenda sináptica. Após a liberação, a DA se difunde e liga-se a receptores de membrana no neurônio pré- ou pós-sináptico, ou transportada por carreadores especializados na membrana do neurônio pré-sináptico. A DA é então degradada no interior das células por monoamina-oxidase (MAO) e catecol-O-metil-transferase (COMT) (Figura 4) (GRANNER, 2000).

**Figura 4.** Sinapse dopaminérgica.



**Fonte:** Domínio público

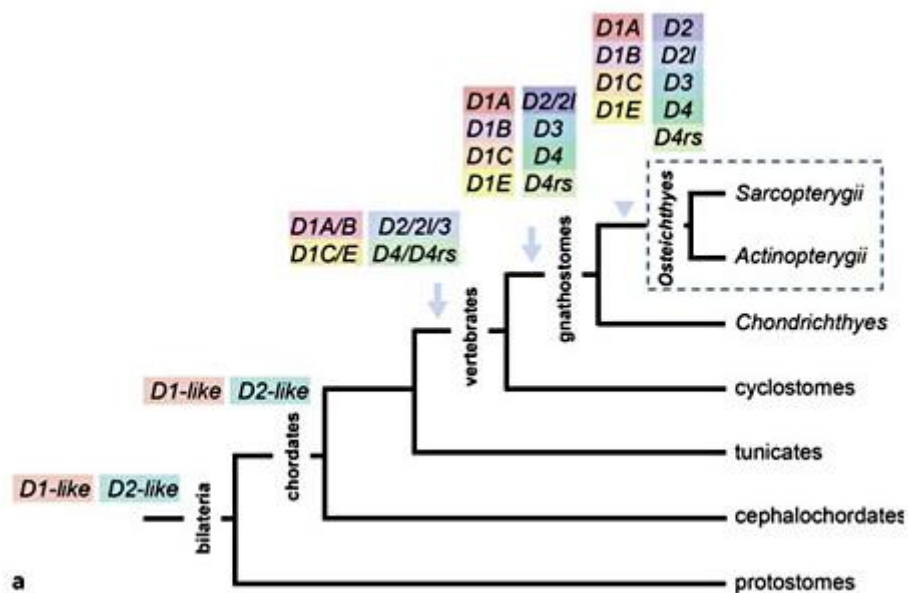
A dopamina é degradada em 3,4-dihidroxiacetilaldeído (DOPAL) pela MAO, no interior do citoplasma. A maioria dos vertebrados apresenta duas isoformas - MAO-A e MAO-B - com diferentes afinidades para catecolaminas e indolaminas. A MAO-A é responsável pela oxidação de feniletilamina, serotonina, noradrenalina, e DA, enquanto a MAO-B apresenta maior afinidade por dopamina (WESTLUND, 1985). Em zebrafish, no entanto, somente uma isoforma da MAO está presente, zMAO. A zMAO parece exibir um local de ligação do substrato quase idêntica à MAO A e uma estrutura semelhante à MAO B (SETINI et al., 2005).

## 2.2.2 Receptores dopaminérgicos

Existem 5 tipos de receptores de dopamina D1, D2 (D2a e D2b), D3, D4 e D5 (RICCI et al., 2001). Em mamíferos, os subtipos de receptores estão presentes em cérebro, coração, glândula suprarrenal e sistema gastrointestinal (SIDHU & NIZNIK, 2000). Os receptores são divididos em dois grupos com base em suas semelhanças, e são receptores associados a proteínas G de membrana (GPCR). A classe D1 inclui os receptores D1 e D5, ligados à estimulação da adenilato ciclase. A classe D2 inclui os receptores D2, D3 e D4, ligados à inibição da adenilato ciclase ou não relacionados a enzima (RICCI et al., 2001).

Em peixes da classe *Osteichthyes*, nove subtipos são observados como consequência da duplicação gênica durante a evolução dos vertebrados (Figura 5). Em geral, quatro receptores da família D1 (D1, D5, D6 e D7) e cinco da família D2 (D2, D3, D4, D8 e D9). Os mamíferos perderam muitos genes de receptores de dopamina, em comparação com outros grupos de vertebrados, mantendo apenas os cinco genes de dopamina a partir de ancestrais (D1 a D5) (YAMAMOTO et al., 2015).

**Figura 5.** Quadro evolutivo dos genes de receptores de dopamina nos vertebrados. Setas indicando as duplicações do genoma, e a ponta da seta indica uma duplicação de genes. Um único gene D1 e D2 nos cordados foram provavelmente duplicada duas vezes, antes e depois da separação ciclostomes-gnathostomados.



Fonte: Adaptado de Yamamoto *et al.*, 2015



As principais vias dopaminérgicas e receptores em mamíferos são encontradas no cérebro do peixe-zebra exceto receptor D5 (PANULA et al., 2010; MAXIMINO, 2010). O peixe-zebra partilha cerca de 70% do código genético humano e sequências de aminoácidos de receptores D1 e D4 estão na mesma ordem (BOEHMLER, 2013). Desta forma é esperado que fármacos agonistas ao sistema dopaminérgico mostrem aumento da atividade locomotora e antagonistas diminuam, semelhantes aos mamíferos (IRONS *et. al.*, 2013).

Em estudo comparativo com humano e peixe-zebra, a sequência de aminoácidos para receptores D1 e D3 são idênticas. Os peixes possuem três subtipos (A, B e C) de ambos os receptores D2 e D4, porém apenas um de receptor D1 e D3. Apresenta homologia de 80 a 95% para receptores D2 e D4, com subtipos A e C mais conservados que o subtipo B, com humanos (EK, 2016). Receptores D4 possui particular interesse devido expressão significativa no córtex frontal (MRZLJAK et al., 1996), região do cérebro onde a sinalização de DA pode modular a memória de trabalho e o estabelecimento de campos de memória (WILLIAMS & GOLDMAN-RAKIC, 1995).

### **2.2.3 Organização anatômica do sistema dopaminérgico no peixe-zebra**

A distribuição de células expressando os neurotransmissores de monoaminérgicos, incluindo os de dopamina, foram descritas no cérebro de rato, e nomeadas como A1-A12 (DAHLSTRÖM & FUXE, 1964). Mais tarde foram revelados grupos adicionais de células A13-A17 (BJÖRKLUND & LINDVALL, 1984). Esta nomenclatura é utilizada para as células dopaminérgicas, devido estas não estarem localizadas sempre em um único núcleo (YAMAMOTO & VERNIER, 2011). As células de DA são classificadas no diencéfalo-mesencéfalo (A8-A10), prosencéfalo posterior (A11-A15), bulbo olfativo (A16) e retina (A17) (SMEETS & GONZÁLEZ, 2000).

Os neurônios que expressam DA na retina são encontradas em todas as espécies de vertebrados, com exceção do *Myxinidae* (retina simplificada devido a vida no escuro) (HOLMBERG, 1970). As células da retina são divididas em duas categorias, as amácrinas localizadas na camada nuclear interna e camada plexiforme interna e as células interplexiformes (MASLAND, 2001). No bulbo olfativo foram encontradas células de DA em

todos os grupos de vertebrados, localizadas geralmente em posição justaglomerular (YAMAMOTO & VERNIER, 2011).

Grupos celulares do prosencéfalo posterior são encontrados em mamíferos e são divididos em cinco grupos: projeção diencéfalo-espinhal (A11), túbero-infundibular (A12), incerto-hipotalâmico (A13), túbero-hipofisiário (A14) e diencéfalo (A15) (BJORKLUND & LINDVALL, 1984).

A população de células do mesencéfalo (A8-A10), são muito estudadas devido a doenças psiquiátricas (esquizofrenia, hiperatividade, Parkinson), mas não são restritas ao mesencéfalo, se estendem a área diencefálica ventral (WISE, 2009).

Evidências sugerem que o peixe-zebra tem uma via dopaminérgica conservada e homóloga à via nigroestriatal humana, e duas outras vias dopaminérgicas foram descritas que podem representar os homólogos de peixe-zebra de vias mesolímbicas e mesocorticais encontrados em mamíferos (RINK & WULLIMANN, 2001).

Os teleósteos possuem células interplexiformes que sintetizam DA na retina e peixes cartilaginosos e anfíbios possuem as células amácrinas (AGATHOCLEUS & HERRIS, 2009). Vários grupos de células DA diencefálicas são propostas no peixe-zebra, e são semelhantes as células A11 de mamíferos (RYU et al., 2007). As células A12 nos peixes, parte anteroventral da área pré-óptica (PPA) regula a liberação de LH na hipófise anterior, semelhante aos mamíferos (KAH et al., 1984).

Muitos dos efeitos da dopamina na hipófise são desempenhados através de receptores D2, que inibem a secreção de vários hormônios. Em peixes esse efeito é observado pela regulação de prolactina, a qual desempenha importante tarefa na osmorregulação (LIU et al., 2006).

Grupos de células DA do mesencéfalo (A8-A10) não são encontradas em teleósteos (MEEK, 1994). Porém, neurônios dopaminérgicos são encontrados no tubérculo posterior, órgão paraventricular e núcleo tuberal posterior, se assemelhando a células A11 de mamíferos (PARENT & NORTHCUUT, 1982).

#### 2.2.4 Controle do sistema dopaminérgico sobre o estresse

Na região do hipotálamo de peixe-zebra são encontradas quatro populações de neurónios TH-ir (tirosina hidroxilase imunorreativas). O primeiro grupo aparece na zona dorsal do hipotálamo periventricular e um segundo grupo na zona caudal, estes neurónios são considerados do tipo 3, pequenas células redondas com líquido cefalorraquidiano de contato (CSF). Um terceiro grupo de células em contato com o CSF (tipo 3) ocorre em torno do ventrículo posterior do diencéfalo e o quarto grupo no núcleo lateral do hipotálamo, este formada por células redondas pequenas (tipo 1) com um fluxo de fibras que percorre dorso-lateralmente. Dentro do hipotálamo, células marcadas ocorrem em todas as três subdivisões, ou seja, zonas dorsal, ventral e caudal do hipotálamo periventricular, e, adicionalmente, no núcleo hipotalâmico lateral (RINK & WULLIMANN, 2001).

Há evidência de inervação direta catecolaminérgica e serotoninérgica nos neurónios produtores de CRH no hipotálamo, e esses e outros neurotransmissores parecem influenciar a liberação de CRH (OWEN et al., 1978).

São encontradas no hipotálamo caudal o maior grupo de células que expressam TH2 em peixe-zebra, chegando a 10 grupos de células (CHEN et al., 2009). O stress social, durante a formação de uma hierarquia comportamental dominante/subordinado regula a expressão de TH2 no cérebro (PAVLIDIS et al., 2011) e aumenta o nível de dopamina e seus metabólitos (TELES et al., 2013). A expressão do gene TH2 é afetada por condições ambientais como a hipóxia (STEELE et al., 2011).

O aumento da expressão do gene precoce imediato (*c-fos*) em células dopaminérgicas de larvas de peixe-zebra é evidente no grupo de células dopaminérgicas do tubérculo posterior, quando expostas a evento estressante. O estresse social e a exposição a amônia induzem a expressão de gene *c-fos* no hipotálamo caudal do peixe-zebra. No entanto, o número de células positivas para ambos *c-fos* de ARNm e proteína de TH2 era baixa, o que sugere que a maioria das células TH2 não são diretamente acionados pelo estresse ou ainda o tratamento com proteinases ou aquecimento prolongado pode diminuir esta expressão (SEMENOVA et al., 2014).

O estresse prolongado exerce função sobre a atividade de enzimas como a TH, DBH e PNMT, através dos glicocorticoides, ACTH e atividade neural. Em roedores a administração

de corticosterona, semelhante ao nível plasmático quando em momentos de estresse, provocou aumento dos níveis de dopamina (PIAZZA et al., 1996).

Os neurônios dopaminérgicos têm exercido papel fundamental na cognição e efeitos comportamentais em situação de estresse (WATANABE et al., 1984). A ativação comportamental ou condições de estresse em ambientes novos, em roedores, aumentam a atividade de dopamina nas regiões mesolímbica e cortical do encéfalo (EENRICO et al., 1998). A exposição aguda ao som e a vibração corporal induzem ao estresse, regulados pelo sistema dopaminérgico mesocortical (NAKAMURA et al., 1992).

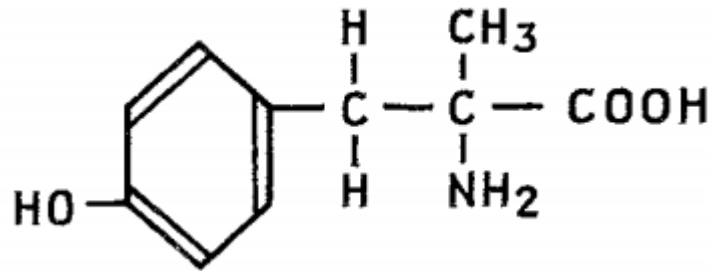
Em um estudo para verificar a relação entre cortisol, liberação de DA, e abuso de drogas em humanos, pacientes com maior nível de estresse (cortisol) apresentavam maior liberação de DA induzida por anfetamina (OSWALD, 2005). Estudos com roedores demonstraram que animais estressados possuíam níveis elevados de DA mesocorticolímbica (CADONI, et al., 2003; CUADRA, et al., 2001).

Outros dois estudos utilizando antipsicóticos risperidona e aripiprazol, em um modelo de estresse agudo em zebrafish, foi possível observar bloqueio do eixo neuroendócrino hipotálamo-hipófise-interrenal. O bloqueio da produção de cortisol, parece ter origem a nível de SNC, mais precisamente por via dopaminérgica (D2) e/ou serotoninérgica (5HT2A) (IDALENCIO et al., 2015; BARCELLOS et al., 2016).

### 2.3 *a*-metil-*para*-tirosina (AMPT)

A AMPT (L-2-methyl-3-(4-hydroxyphenyl) (Figura 6) é um análogo estrutural não endógeno da tirosina, potente inibidor competitivo, que é transportado nas terminações nervosas, onde inibe de forma competitiva a tirosina hidroxilase, enzima limitante, da via dopaminérgica, na biossíntese de catecolaminas (SJOERDSMA et al., 1965; NAGATSU et al., 1964; BEAR et al., 2002). A partir desta inibição as CAs, DA e NE, sofrem uma diminuição significativa em suas concentrações nas fendas sinápticas (ENGELMAN et al., 1968).

**Figura 6.** Fórmula estrutural do AMPT.



**Fonte:** Sjoerdsma et al. (1965).

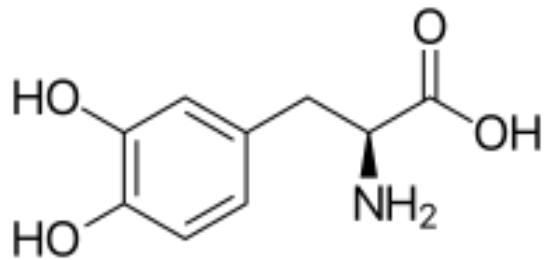
Este fármaco é classificado como anti-hipertensivo e possui ensaios no tratamento do feocromocitoma, neoplasia caracterizada por secretar CAs. Porém raramente é utilizado na terapia médica, ficando apenas para investigações científicas acerca da depleção das CAs (O'LEARY et al., 2007). Após sua administração, é bem absorvida no sistema gastrointestinal, com redução das catecolaminas verificada através da excreção urinária de seus metabólitos. Aproximadamente 69% da AMPT é excretada na forma ativa pela urina. Seu efeito máximo, após administração oral, ocorre em 48 a 72 horas e os níveis de CAs retornam ao normal em até 96 horas após a última ingestão. Os principais efeitos colaterais no SNC verificados são: mudanças no padrão do sono após remoção da medicação e alterações de humor, sedação e sintomas extrapiramidais (ENGELMAN et al., 1968).

#### 2.4 LEVODOPA / L-DOPA

A levodopa (Ácido (S) - 2 - amino - 3 - (3,4 - diidróxifenil) propanoico) (Figura 7) é um aminoácido que faz parte do grupo das CAs, isômero da DOPA, que vem sendo sintetizada desde a primeira metade do século XX e utilizado no tratamento da doença de Parkinson com o objetivo de repor dopamina (CORVOL & MARIANI, 2018; EBADA et al., 2019; ROMAGNOLO et al., 2019). Ao contrário da DA a levodopa atravessa a barreira hematoencefálica e é convertida, pela enzima dopa descarboxilase, em DA no SNC. Uma vez convertida em dopamina, ativa os receptores dopaminérgicos pós-sinápticos e compensa a diminuição de DA endógena (REICH & SAVITT, 2019). Além de estar envolvida na

formação de DA, é um precursor fundamental dos hormônios epinefrina e norepinefrina (VILHENA et al., 2014).

**Figura 7.** Fórmula estrutural da levodopa.



**Fonte:** Franco (2016).

A levodopa também sofre efeito da dopa descarboxilase em tecidos periféricos, antes mesmo de chegar ao SNC, provocando redução da eficácia da medicação (PREDIGER et al., 2014). Por este motivo inibidores da descarboxilação, como a carbidopa, são utilizados associados, com objetivo de retardar o processo e aumentar a concentração de levodopa para atravessar a barreira hematoencefálica e ser convertida em DA (HOUT, 2014).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se ocorre modulação dopaminérgica do eixo neuroendócrino de estresse em peixe-zebra (*Danio rerio*).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar se a exposição prévia ao AMPT, altera os níveis de cortisol frente a estresse agudo em peixe-zebra.

Avaliar alterações nos níveis de cortisol frente ao fármaco levodopa, em zebrafish estressados (submetidos a estresse agudo de manipulação) e não-estressados.

Avaliar alterações nos níveis de cortisol frente ao fármaco levodopa associado ao AMPT, em zebrafish estressados (submetidos a estresse agudo de manipulação) e não-estressados.

#### 4 ARTIGOS

Neste capítulo serão apresentados dois artigos. O primeiro artigo intitulado “ $\alpha$ -methyltyrosine, a tyrosine hydroxylase inhibitor, decreases stress response in zebrafish (*Danio rerio*)”, publicado na revista *General and Comparative Endocrinology*, em Julho de 2017, sob DOI: 10.1016/j.ygcen.2017.07.012, ISSN 0016-6480 (Qualis B1 nas Ciências Biológicas II e fator de impacto de 2,585).

O segundo artigo foi submetido na mesma revista em Abril de 2019, intitulado “Effect of levodopa on stress response in zebrafish”.



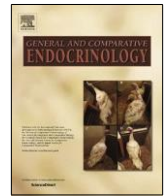
## 4.1 ARTIGO 1

General and Comparative Endocrinology 252 (2017) 236–238



Contents lists available at ScienceDirect

## General and Comparative Endocrinology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ygcn](http://www.elsevier.com/locate/ygcn)

## Short communication

## **a**-Methyltyrosine, a tyrosine hydroxylase inhibitor, decreases stress response in zebrafish (*Danio rerio*)



Renan Idalencio <sup>a,b</sup>, Heloísa Helena de Alcântara Barcellos <sup>a,b</sup>, Fabiana Kalichak <sup>a</sup>, João Gabriel Santos da Rosa, Thiago Acosta Oliveira, Murilo Sander de Abreu <sup>a</sup>, Michele Fagundes <sup>b</sup>, Fernanda Dametto <sup>c</sup>, Letícia Marcheto <sup>b</sup>, Caio Maximino de Oliveira <sup>d</sup>, Leonardo José Gil Barcellos <sup>a,b,c,†</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Cidade Universitária, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

<sup>b</sup> Universidade de Passo Fundo (UPF), BR 285, São José, Passo Fundo, RS 99052-900 Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo (UPF), BR 285, São José, Passo Fundo, RS 99052-900 Brazil

<sup>d</sup> Instituto de estudos em saúde e biológicas, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (UNIFESPA), Loteamento Cidade Jardim, Avenida dos Ipês, s/n, Bairro Cidade Jardim, Nova Marabá, Marabá, PA 68500-000 Brazil

### article info

#### Article history:

Received 19 January 2017

Revised 21 June 2017

Accepted 12 July 2017

Available online 14 July 2017

#### Keywords:

Dopaminergic control

AMPT

Stress response

Cortisol

Hypothalamus-pituitary-adrenal axis

### abstract

In this article, we show that the tyrosine hydroxylase inhibitor **a**-Methyl-*p*-tyrosine (AMPT) decreased the responsiveness of the zebrafish stress axis to an acute stressful challenge. These effects were specific for responses to stimulation, since unstimulated (basal) cortisol levels were not altered by AMPT. Moreover, AMPT decreased the stress response 15 min after stimulation, but not after that time period. To our knowledge, this is the first report about the effects of AMPT on the neuroendocrine axis of adult zebrafish in acute stress responses. Overall, these results suggest a mechanism of catecholamine-gluocorticoid interplay in neuroendocrine responses of fish, pointing an interesting avenue for physiological research, as well as an important endpoint that can be disrupted by environmental contamination. Further experiments will unravel the mechanisms by which AMPT blocked the cortisol response.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Stress is defined by physiological, behavioral and biochemical changes in consequence of threats to homeostasis (Chrousos and Gold, 1992), cortisol being the most used indicator to evaluate acute stress in fish (Bonga, 1997). Loss in the ability of increasing plasma cortisol in response to threat makes the animal physiologically compromised, not responding appropriately to common stressors. This deficit of responsiveness to stressful challenges makes the animal more susceptible to environmental demands, and the rate of survival can interfere at the population level (Bonga, 1997; Pacheco and Santos, 2001).

The changes in cortisol level appear to be linked to catecholamine (CA) levels in many species (Hontela, 1998; Piazza et al., 1996; Enrico et al., 1998), with evidence of catecholaminergic and serotonergic innervation at corticotropin releasing-factor (CRH)-producing neurons in the hypothalamus; CAs and serotonin appear to induce the release of CRH in the hypothalamus

(Nakamura et al., 1992). CAs in the central nervous system of vertebrates include dopamine (DA) and norepinephrine (NE), which are involved in locomotion, cognition, emotion and neuroendocrine function (Owens and Nemeroff, 1993; Missale et al., 1998). The synthesis of both CAs depend on *L*-tyrosine, which is metabolized by tyrosine hydroxylase (TH) in CAergic terminal nerves. TH performs the conversion of *L*-tyrosine in *L*-DOPA (Emilien et al., 1999; Cooper et al., 1996; Freund et al., 1984), representing the rate-limiting step in the synthesis of DA and NE (Yamamoto and Vernier, 2011; Nagatsu et al., 1964). *L*-DOPA is then converted in DA through *L*-aromatic aminoacid decarboxylase (DDC) enzyme, which is abundant in catecholaminergic neurons (Levitt et al., 1965). *L*-tyrosine analogues like **a**-methyl-*para*-tyrosine (AMPT) are powerful competitive inhibitors of TH, decreasing the availability of CAs (Ankenman and Salvatores, 2007).

In zebrafish larvae, stressful stimuli activate TH-positive cells in the caudal hypothalamus, suggesting a role for CAs in the regulation of stress responses (Semenova et al., 2014). Moreover, we have recently showed that risperidone (Idalencio et al., 2015) and aripiprazole (Barcellos et al., 2016), antipsychotic drugs which block dopamine D<sub>2</sub> receptors, blunts cortisol responses. As such, the

<sup>†</sup> Corresponding author at: Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo (UPF), BR 285, São José, Passo Fundo, RS 99052-900 Brazil.

E-mail address: [lbarcellos@upf.br](mailto:lbarcellos@upf.br) (L.J.G. Barcellos).

working hypothesis of this paper was that decreasing CAergic tone with the use of  $\alpha$ -Methyl-p-tyrosine (AMPT) can affect the function of the stress neuroendocrine axis. We tested the hypothesis using adult zebrafish (*Danio rerio*) as experimental model, since this species presents numerous advantages like the grouping behavior and maintenance as well as the high genetic homology with the human being (Weiner and Molinoff, 1989; Barbazuk et al., 2000; Goldsmith, 2004). Recent studies have been reinforcing their use as a model organism to the study of stress (Goldsmith, 2004; Egan et al., 2009; Cachat et al., 2010; Oliveira et al., 2013; Barcellos et al., 2007, 2010; Piato et al., 2011).

## 2. Material and methods

### 2.1. Ethical note

This study followed the guidelines of Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) and was approved by the Ethics Commission for Animal Use of the University of Passo Fundo, UPF, Passo Fundo, RS, Brasil (Protocol 0024/2016 – CEUA).

### 2.2. Animals

A population of approximately 250 mixed-sex adult wild-type zebrafish, short-fin (SF) phenotype, weighing 0.3–0.5 g, was kept in glass aquariums with constant aeration and equipped with biological filtering under a natural photoperiod (14 h of light/10 h of darkness). The water was maintained at  $26 \pm 2$  °C and pH 7.0, with  $6 \pm 0.5$  mg dissolved oxygen levels,  $6 \pm 0.5$  mg/L, 0.01 mg/L total ammonia levels, 6 mg/L total hardness levels and alkalinity of 22 mg/L CaCO<sub>3</sub>.

### 2.3. Experiment – Acute stress

Fish were distributed in 18 glass aquarium (12 × 12 × 12 cm, six fish per tank) and fed with commercial food flakes (Tetra Min, Tetra, Melle, Germany). The experimental design was a full factorial 2 (stressed vs. non-stressed) X 3 (AMPT concentration) X 3 (interval of cortisol analysis after stress) design, as follows: After distributing fish in each tank, animals were exposed to AMPT ( $n = 6$  per group) in two consecutive sessions separated by 24 h; animals were kept in the AMPT solution during the interval. 24 h after the second exposure, they were stressed by a net for 2 min (Oliveira et al., 2013) and gathered after 0, 15, 60 and 240 min for the whole-body cortisol analysis. Similarly, groups of fish ( $n = 6$  per group) were exposed by AMPT without stress, and their cortisol levels assessed at the same time frames, with the aim of evaluating the permissive role of CAs on cortisol levels. Another set of groups a basal situation, that is, without drug exposure and stress test, was performed as control. For each group, the experiment was replicated 3 times, with 2 fish from each tank in each replication, totalizing a final sample of 6 fish ( $n = 6$ ) per group.

$\alpha$ -Methyl-L-tyrosine (L-2-Methyl-3-(4-hydroxyphenyl) alanine, (Cod. M8131, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, Missouri, EUA) was used in two concentrations: 10  $\mu$ M and 25  $\mu$ M. These concentrations were based on Airhart et al. (2012).

### 2.4. Cortisol extraction

After capturing the fish, animals were frozen in liquid nitrogen for 10–30 s, followed by their storage at  $-20$  °C until cortisol extraction. Tissue extracts were suspended in 200 mL of PBS and the cortisol levels were measured in duplicate for each extraction using commercially available enzyme-linked immune sorbent assay kit (EIAgen cortisol test, Bio ChemImmuno Systems). This kit

was fully validated for zebrafish tissue extracts using the methodology described by Sink et al. (2007).

### 2.5. Statistics

Cortisol levels were analyzed by a three-way Analysis of Variance (ANOVA) with treatment, stress and sampling time as independent variables. Tukey's multiple comparisons tests were used to discriminate the differences between groups at a given time point; to increase statistical power, differences between time points were not analyzed. The homogeneity of variance was determined using Hartley's test and the normality was determined using the Kolmogorov-Smirnov test. Data was expressed as average  $\pm$  standard error for the mean. Significance level was set at  $p < 0.001$ .

## 3. Results

After acute stress, cortisol levels were increased in stressed, non-exposed animals 15 min after net chasing, returning to control levels 60 min after stress (Fig. 1); the effect of the acute stressor was blunted by AMPT treatment ( $F_{10, 60} = 4.234$ ,  $p = 0.0002$  for the interaction term). No difference was found between AMPT concentrations on their blunting effect ( $p = 0.46$ ). Basal cortisol levels were not altered by AMPT treatment at any time point ( $p > 0.25$  for all post-tests).

## 4. Discussion

Here we show that AMPT decreased the responsiveness of the zebrafish stress axis to an acute stressful challenge. These effects were specific for responses to stressful stimulation, since unstimulated cortisol levels were not altered by AMPT. Moreover, AMPT decreased the stress response 15 min after stimulation, but not after that time period. To our knowledge, this is the first report about the effects of  $\alpha$ -Methyl-L-tyrosine on the neuroendocrine axis of adult zebrafish in acute stress responses.

$\alpha$ -Methyl-L-tyrosine acts as a potent competitive tyrosine hydroxylase (TH) inhibitor, not allowing the L-tyrosine conversion in L-DOPA and consequently L-DOPA in dopamine or norepinephrine (Weiner and Molinoff, 1989). Thus, zebrafish exposed to AMPT deplete their dopamine or norepinephrine reserves in the dopaminergic or norepinephrinergic neuron and ganglion vesicles.

Evidences suggest direct catecholaminergic innervation in neurons that produce corticotropin-releasing hormone (CRH) in the hypothalamus, and that these and other neurotransmitters appear

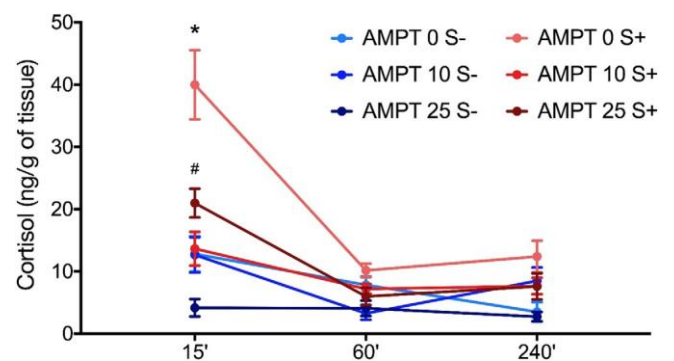


Fig. 1. Cortisol levels in fish exposed or not to AMPT treatment. Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of mean. Data were compared by a three-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparisons test. \* $P < 0.05$  vs. all other groups; # $P < 0.05$  vs. AMPT 25 S- ( $n = 6$  in all sample points).

to induce the release of CRH (Owens and Nemeroff, 1993). DAergic neurons have been suggested to play a key role in cognition and behavioral effects in stressful situations (Watanabe et al., 1984).

In other species the CA/stress relation seems to be more clarified, with stress increasing catecholamines (e.g., Enrico et al., 1998; Piazza et al., 1996; Nakamura et al., 1992), and in turn DAergic neurotransmission increasing, and NEergic transmission decreasing, glucocorticoid responses (see Tuomisto and Männistö, 1985, for a comprehensive review). In zebrafish, stressful stimuli activate CAergic neurons of the caudal hypothalamus (Semenova et al., 2014), and DAergic antagonists blunt the cortisol response to stress (Idalencio et al., 2015). Given the opposite roles of DA and NE in the regulation of vertebrate stress responses (Tuomisto and Männistö, 1985), it is likely that the AMPT effect is mostly DAergic; however, further experiments are needed to confirm this secondary hypothesis.

Blockade of dopamine and norepinephrine synthesis, through the competitive inhibition TH with *α*-methyl-L-tyrosine (AMPT), changes the neuroendocrine axis of stress in zebrafish. These results suggest that the CAergic tone is necessary for the appropriate glucocorticoid response to stressful challenges. Again, whether the catecholamine involved is dopamine or norepinephrine is still unknown. Since AMPT itself did not change cortisol levels in unstimulated animals, catecholamines are best understood as stimulatory of the cortisol response instead of permissive. Moreover, since AMPT effects were not seen on cortisol levels 60 or 240 min after net chasing, it is unlikely that negative feedback on the hypothalamus-hypophys-interrenal axis was affected. Since AMPT has been reported to produce primary fatigue and sedation in humans (Engelman et al., 1968; Sjoerdsma et al., 1965), it is possible that mild sedation and/or anxiolysis is responsible for the decreased responsiveness, and therefore decreased arousal resulted in decreased stress responsiveness. Overall, these results suggest a mechanism of catecholamine-glucocorticoid interplay in neuroendocrine responses of fish, pointing an interesting avenue for physiological research, as well as an important endpoint that can be disrupted by environmental contamination. Further experiments will unravel the mechanisms by which AMPT blocked the cortisol response.

## Acknowledgments

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil). L.J.G. Barcellos is recipient of CNPq fellowship grant (301992/2014-2). Authors thank Angelo Piato from the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, for help on data analysis.

## References

- Airhart, M.J., Lee, D.H., Wilson, T.D., Miller, B.E., Miller, M.N., Skalko, R.G., Monaco, P. J., 2012. Adverse effects of serotonin depletion in developing zebrafish. *Neurotoxicol. Teratol.* 34 (1), 152–160. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2011.08.008>.
- Ankenman, R., Salvatores, M.F., 2007. Low dose Alpha-Methyl-Para-Tyrosine (AMPT) in the treatment of dystonia and dyskinesia. *J. Neuropsychiatr. Clin. Neurosci.* 19 (1), 65–69. Winter.
- Barbazuk, W.B., Korf, I., Kadavi, C., Heyen, J., Tate, S., Wun, E., 2000. The synthetic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* 10, 1351–1358. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.144700>, pmid:10984453.
- Barcellos, L.J.G., Ritter, F., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Silva, L.B., Bedin, A.C., et al., 2007. Whole body cortisol increases after direct and visual contact with the predator in zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture* 272, 774–778. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.09.002>.
- Barcellos, L.J.G., Ritter, F., Kreutz, L.C., Cericato, L., 2010. Can Zebrafish *Danio rerio* learn about predation risk? The effect of a previous experience on the cortisol response in subsequent encounters with a predator. *J. Fish Biol.* 76, 1032–1038. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02542.x>.
- Barcellos, H.H.A., Kalichak, F., Rosa, J.G.S., Oliveira, T.A., Koakoski, G., Idalencio, R., Abreu, M.S., Giacomini, A.C.V., Fagundes, M., Variani, C., Rossini, M., Piato, A.L., Barcellos, J. Waterborne aripiprazole blunts the stress response in zebrafish. *Sci. Rep.* 6, 37612. <http://dx.doi.org/10.1038/srep37612>.
- Bonga, W.S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77 (3), 591–625.
- Cachat, J., Stewart, A., Grossman, L., Gaikwad, S., Kadri, F., Chung, K.M., et al., 2010. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nat. Prot.* 5 (11), 1786–1799. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2010.140>.
- Chrousos, G.P., Gold, P.W., 1992. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 9.
- Cooper, J.R., Bloom, F.E., Roth, R.H., 1996. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. Oxford University Press, New York/Oxford, pp. 293–351.
- Egan, R., Bergner, C.L., Hart, P.C., Cachat, J.M., Canavello, P.R., Elegance, M.F., et al., 2009. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 205, 38–44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022>, pmid:19540270.
- Emilien, G., Maloteaux, J.M., Geurts, M., Hoogenberg, K., Cragg, S., 1999. Dopamine receptors—physiological understanding to therapeutic intervention potential. *Pharmacol. Ther.* 84, 133–156.
- Engelman, K., Horwitz, D., Jéquier, E., Sjoerdsma, A., 1968. Biochemical and pharmacologic effects of  $\alpha$ -methyltyrosine in man. *J. Clin. Invest.* 47, 577–591.
- Enrico, P., Bouma, M., Vries, J., Wexterink, B., 1998. The role of afferents to the ventral tegmental area in the handling stress-induced increase in the release of dopamine in the medial pre-frontal cortex: a dual-probe microdialysis study in the rat brain. *Brain Res.* 779, 205–213.
- Freund, T.F., Powell, J.F., Smith, A.D., 1984. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience* 13, 1189–1215.
- Goldsmith, P., 2004. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4, 504–512. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2004.04.005>, pmid:15351356.
- Hontela, A., 1998. Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: in vivo and in vitro assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 17 (1), 44–48.
- Idalencio, R., Kalichak, F., Rosa, J.G.S., Oliveira, T.A., Koakoski, G., Gusso, D., et al., 2015. Waterborne risperidone decreases stress response in zebrafish. *PLoS One* 10 (10), e0140800. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0140800>.
- Levitt, M., Sjoerdsma, A., Udenfriend, S., 1965. Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 23, 1493–1501.
- Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G., 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 78, 189–225.
- Nagatsu, T., Levitt, M., Udenfriend, S., 1964. Tyrosine hydroxylase: the initial step in norepinephrine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 239, 2910–2917.
- Nakamura, H., Morogi, T., Nohara, S., Nakamura, H., Okada, A., 1992. Activation of cerebral dopaminergic systems by noise and whole-body vibration. *Environ. Res.* 10 (18).
- Oliveira, T.A., Koakoski, G., Kreutz, L.C., Ferreira, D., Rosa, J.G.S., Abreu, M.S., et al., 2013. Alcohol impairs predation risk response and communication in zebrafish. *PLoS One* 8 (10), e75780. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0075780>.
- Owens, M.J., Nemeroff, C.B., 1993. *The Ole of HLC in the Pathophysiology of Affective Disorders*. John Wiley & Sons, New York.
- Pacheco, M., Santos, M.A., 2001. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49 (1), 64–75.
- Piato, A.L., Capiotti, K.M., Tamborski, A., Oses, J.P., Barcellos, L.J.G., Bogo, M.R., et al., 2011. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. *Prog. Neuro-Psychopharm. Biol. Psychiatry* 35, 561–567. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.12.018>.
- Piazza, P.V., Rouge-Pont, F., Deroche, V., Maccari, S., Simon, H., Le Moal, M., 1996. Glucocorticoids have state-dependent stimulant effects on the mesencephalic dopaminergic transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 8716–8720.
- Semenova, S.A., Chen, Y.C., Zhao, X., Rauvala, H., Panula, P., 2014. The tyrosine hydroxylase 2 (TH2) system in zebrafish brain and stress activation of hypothalamic cells. *Histochem. Cell Biol.* 142 (6), 619–633. <http://dx.doi.org/10.1007/s00418-014-1240-z>. Epub 2014 Jul 16.
- Sink, T.D., Lochmann, R.T., Fecteau, K.A., 2007. Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu and golden shiners. *Fish Physiol. Biochem.* 75, 165–171. <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-007-9150-9>.
- Sjoerdsma, A., Engelman, K., Spector, S., Udenfriend, S., 1965. Inhibition of catecholamine synthesis in man with alpha-methyl-tyrosine, an inhibitor of tyrosine hydroxylase. *Lancet* 2, 1092–1094.
- Tuomisto, J., Männistö, P., 1985. Neurotransmitter regulation of anterior pituitary hormones. *Pharmacol. Rev.* 37 (3), 249–332.
- Watanabe, T., Taguchi, Y., Shiosaka, S., Tanaka, J., Kubota, H., Terano, Y., Tohyama, M., Wada, H., 1984. Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker. *Brain Res.*, 0006-8993 295 (1), 13–25. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90811-4](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(84)90811-4).
- Weiner, N., Molinoff, P.B., 1989. Catecholamines. In: Siegel, G.J., Agranoff, B., Albers, R.W., Molinoff, P.B. (Eds.), *Basic Neurochem.* fourth ed. Raven Press, New York, pp. 233–251.
- Yamamoto, K., Vernier, P., 2011. The evolution of dopamine systems in chordates. *Institute of Neurobiology Alfred Fessard, CNRS, Gif-sur-Yvette, France. Front. Neuroanat.*

## 4.2 ARTIGO 2

Submetido na revista *General and Comparative Endocrinology* em abril de 2019, intitulado:

**Effect of levodopa on stress response in zebrafish**

Renan Idalencio<sup>1,2</sup>, Taise Miranda Lopes<sup>3</sup>, Suelen Mendonça Soares<sup>1</sup>, Aline Pompermaier<sup>4</sup>,  
Heloísa Helena de Alcantara Barcellos<sup>1,2</sup>, Fabiana Kalichak<sup>1</sup>, Michele Fagundes<sup>2</sup>, Caio  
Maximino de Oliveira<sup>5</sup>, Leonardo José Gil Barcellos<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM),  
Av. Roraima, 1000, Cidade Universitária, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil, 97105-900

<sup>2</sup> Universidade de Passo Fundo (UPF), BR 285, São José, Passo Fundo, RS, Brasil, 99052-900

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Universidade de Passo Fundo (UPF), BR  
285, São José, Passo Fundo, RS, Brasil, 99052-900

<sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Universidade de Passo Fundo (UPF),  
BR 285, São José, Passo Fundo, RS, Brasil, 99052-900

<sup>5</sup> Instituto de estudos em saúde e biológicas. Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará  
(UNIFESPA), Loteamento Cidade Jardim, Avenida dos Ipes, s/n, Bairro Cidade Jardim, Nova  
Marabá, Marabá, PA, Brasil, 68500-000

Running title: Levodopa alters zebrafish stress response

\*Please address correspondence to [lbarcellos@upf.br](mailto:lbarcellos@upf.br)

Tel: +55 54 3316.8100

Fax: +55 54 3316.8487

**Abstract**

The dopaminergic system of zebrafish is very complex, and the numerous routes and receptors in the central nervous system (CNS) are being extensively studied. However, a critical factor for the activation and release of catecholamines (CAs) is the presence of the tyrosine hydroxylase, which converts L-tyrosine to levodopa. Levodopa, in turn, promotes the release of dopamine (DA) and norepinephrine (NE); hence, CAs are fundamental to the balance of hormonal functions. Here, we used levodopa to clarify the involvement of the dopaminergic pathway in stress response in zebrafish subjected to an acute stress challenge. The results showed that levodopa balances the stress response through its action on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) of zebrafish, altering cortisol levels. These effects were specific for stress, as levodopa did not induce alterations in cortisol in unstressed fish. Although these results have elucidated aspects of the mechanism associated with dopamine-glucocorticoid interaction, further research is necessary to expand this knowledge.

Keywords: dopaminergic system, levodopa, stress response, cortisol, hypothalamus-pituitary-adrenal axis.

## 1. Introduction

The dopaminergic system of zebrafish is well-described (Schweitzer et al., 2012), as is the activation and production of dopamine (DA) and norepinephrine (NE) (Yamamoto and Vernier, 2011). These catecholamines (CAs) play important roles in the CNS, particularly in neuroendocrine functions (Missale et al., 2019; Owens and Nemeroff, 1993). The synthesis of DA and NE depends on the availability of tyrosine hydroxylase (TH) (NAGATSU et al., 1964; Yamamoto and Vernier, 2011), which converts L-tyrosine to levodopa (L-DOPA) and results in the liberation of DA and NE (Cooper et al., 2003; Emilien et al., 1999; Freund et al., 1984). In contrast,  $\alpha$ -methyl-*para*-tyrosine (AMPT) is a potent TH inhibitor, which may decrease the availability of CAs (Ankenman and Salvatore, 2007).

The relationship between the dopaminergic pathway and the neuroendocrine HPA axis of stress in zebrafish is still unclear. The stimulation of the HPA axis causes the secretion of cortisol, which is the main indicator of stress in fish (Barton, 2002; Chrousos and Gold, 1992). Changes in cortisol levels appear to be directly related to CAs in various species (Piazza et al., 1996; Enrico et al., 1998); for example, the blockade of CAs occurred in zebrafish exposed to AMPT (Idalencio et al., 2017). The release of corticotrophin-regulating hormone (CRH) in the hypothalamus appears to be triggered by CAs (Nakamura and Okada, 1992), as we have demonstrated, in previous studies of psychotropic drugs and stress, a strong hypotheses for this relationship (Barcellos et al., 2016; Idalencio et al., 2015).

To continue the investigation of dopaminergic control on the stress response, we used a commercial preparation of levodopa only and examined the association with AMPT in zebrafish exposed to an acute stress test. Our hypothesis was that the increase

of the catecholamines affected the HPA axis. To test this hypothesis, we used zebrafish as the experimental model. This model is used widely in research, owing to its important characteristics, such as production, handling, and grouping (Egan et al., 2009), and the power of the pharmacological applications and translational effects (Barcellos et al., 2016; Idalencio et al., 2015; Soares et al., 2018).

## **2. Material and Methods**

### 2.1. Ethical and legal note

This study was approved by the Animal Ethics Committee of the University of Passo Fundo, UPF, Passo Fundo, RS, Brasil (Protocol 0024/2016 - CEUA) and followed the guidelines of the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). In addition, this research was registered in the SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) and complied with their guidelines (registration code A14E252).

### 2.2. Study strategy

To investigate the participation of the dopaminergic pathway on the zebrafish stress response, we planned a study that comprised two experiments. In the first experiment, the zebrafish were exposed to levodopa/carbidopa and then subjected to a stress challenge. In the second experiment, the zebrafish were exposed to two treatments: AMPT (Idalencio et al., 2017), followed by levodopa/carbidopa, with a subsequent stress challenge. In both experiments, we measured whole-body cortisol as biomarker of stress response.

### 2.3. Animals and maintenance

A population of 300 wild-type zebrafish of both sexes (in a 1:1 ratio) with the short-fin (SF) phenotype, weighing 0.3–0.5 g, from a single brood of heterogeneous breeding stock at the Universidade de Passo Fundo, Brasil, was maintained in glass aquariums with constant aeration, equipped with a biological filter under natural photoperiod (14 h light/10 h dark). The zebrafish diet consisted of a commercial flaked food (Alcon Basic©; humidity, 10%; raw protein, 45%; fat extract, 5%). The water was maintained at  $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH } 7.0 \pm 0.2$ ,  $6.1 \pm 0.2$  mg/L dissolved oxygen,  $<0.01$  mg/L total ammonia, total hardness of 6 mg/L, and alkalinity of 22 mg/L  $\text{CaCO}_3$ .

### 2.4. Drugs

In the first experiment, we used the drug levodopa/carbidopa [(S)-2-amino-3-(3,4-dihydroxyphenyl) propanoic acid/(2S)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydrazino-2-methylpropanoic acid; Parkidopa, 250 mg + 25 mg, Cristália, Itapira – SP], at concentrations of 0.1 mM, 0.5 mM, and 1 mM (Stednitz et al., 2015). In the second experiment, we used two treatments at different times: 10  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -methyl-*para*-tyrosine [(L-2-methyl-3-(4-hydroxyphenyl) alanine; M8131, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)] (Idalencio et al., 2017), with levodopa/carbidopa at the same concentrations as in the first experiment. For each experiment, the control tests were performed on fish that were not treated with drugs, but were subjected to the stress test, and fish that were not treated with drugs and were not subjected to the stress test.

### 2.5. Experimental procedures



### 2.5.1. Experiment 1 – Exposure to levodopa/carbidopa

The zebrafish were distributed in 24 glass aquariums (12 cm × 12 cm × 12 cm, with six fish per group) and fed commercial flaked food. The experimental design treated three concentrations of levodopa to stressed and unstressed fish. Measurements were made at 15, 60, and 240 min after the start of the stress test to evaluate the time course of the stress response.

The zebrafish were exposed to levodopa/carbidopa (n = 6) for 30 min and stressed after exposure by being chased with a net for 2 min (Oliveira et al., 2013), and captured and killed after 15, 60, and 240 min for whole-body cortisol analysis (six fish at each time point). Similarly, unstressed groups (n = 6 per group) were exposed to levodopa/carbidopa, and their cortisol levels were evaluated for the same time periods to determine the effect of the drug on cortisol levels in the absence of stress. For each group, the experiment was replicated three times, with two fish from each tank comprising each replicate; in total, there were six fish (n = 6) per group.

### 2.5.2. Experiment 2 – Exposure to AMPT + levodopa/carbidopa

The zebrafish were distributed in 24 glass aquariums (12 cm × 12 cm × 12 cm, six fish per group) and fed commercial flaked food. The experimental design treated the zebrafish with three concentrations controls is detailed of levodopa, in the presence and absence of stress induced by AMPT. The same analysis time points were used as for Experiment 1.

The zebrafish were exposed to AMPT (n = 6 per group) in two consecutive sessions, with an interval of 24 h. The animals were kept in the AMPT solution during this 24h-interval (Idalencio et al., 2017). At 24 h after the second exposure, the

zebrafish were exposed to levodopa/carbidopa for 30 min and then stressed by a being chased with a net for 2 min. The fish were captured and killed at the same times as in the first experiment for whole-body cortisol analysis. Similarly, unstressed groups of fish ( $n = 6$  per group) were exposed to AMPT + levodopa/carbidopa, and their cortisol levels were evaluated for the same time periods, to determine the effect of the drug on cortisol levels in the absence of stress.

### 2.5.3. Cortisol extraction

After the zebrafish were captured, the animals were frozen immediately in liquid nitrogen for 10 to 30 s, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until cortisol extraction. The tissue extracts were suspended in 200  $\mu\text{L}$  PBS and the cortisol levels were measured in duplicate for each extraction by using a commercially available enzyme immunoassay (EIAgen cortisol test, BioChem ImmunoSystems Inc.). This kit was fully validated for extracts of zebrafish tissue (Sink et al., 2008).

### 2.5.4. Statistical analysis

For Experiment 1, the cortisol levels were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) for each time point (15, 60, and 240 min). The independent variables simultaneously considered were both treatments (stress and drug concentration), presenting eight levels. Tukey's multiple-comparison tests were used to discriminate the differences between groups at a given time. The data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean. The level of significance was set at  $p < 0.05$ . In the graphs, the data are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean. The homogeneity of variance was determined using Levene's test and the normality was determined using

the Shapiro-Wilk test. The cortisol levels in Experiment 1 (240 min) were log-transformed to meet the normality assumption.

For Experiment 2, the cortisol levels did not meet homogeneity assumptions and the data were analyzed by the Kruskal-Wallis test for each time point (15, 60, and 240 min), with the same independent variable. Multiple comparison tests were used to distinguish the differences between groups at a given time point. The level of significance was set at  $p < 0.05$ . In graphs, the data are expressed as the median  $\pm$  standard error of the mean.

### **3. Results**

#### 3.1. Experiment 1 – Exposure to levodopa/carbidopa

The acute stress protocol increased cortisol levels in zebrafish compared to those in the stressed control and the unstressed zebrafish, for a period of 15 min. At the same time, the concentrations of 0.1 and 1 mM were not different from the stressed control group, whereas the intermediate concentration (0.5 mM) blocked the stress axis (Fig. 1 - A). At 60 and 240 min after stress, cortisol returned to baseline levels; no difference between treatments was observed (Fig. 1 - B and C).

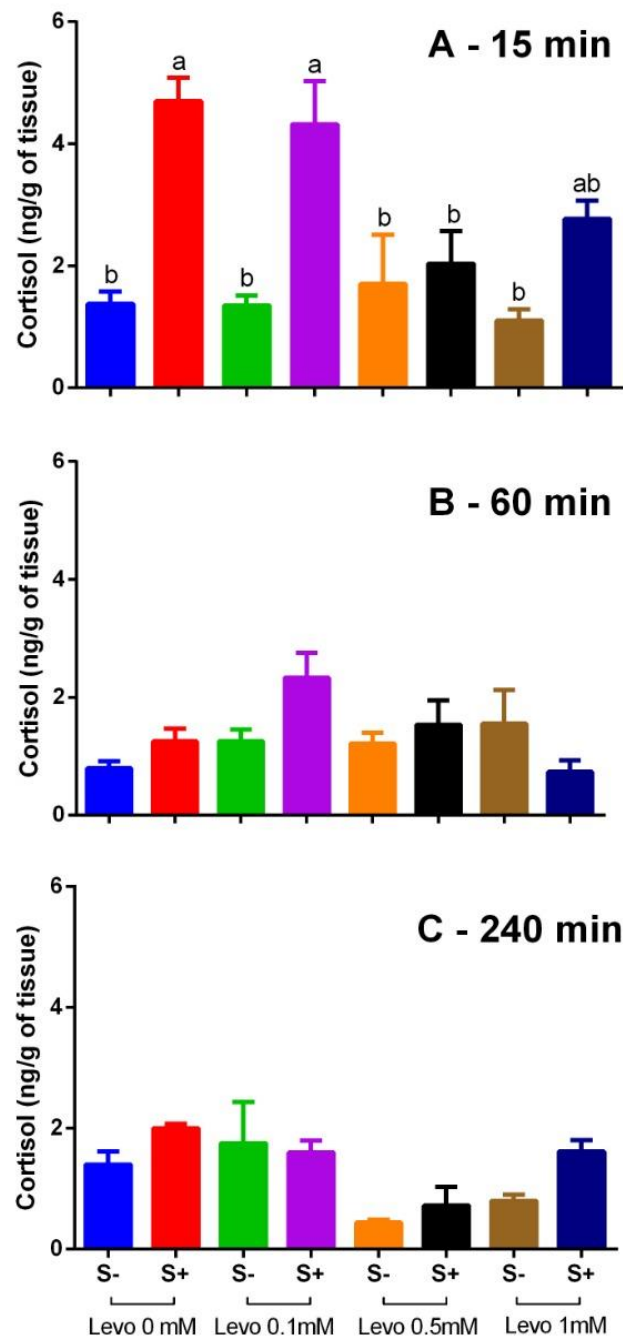


Figure 1 - Concentration of cortisol in zebrafish exposed to levodopa/carbidopa treatment or to the control treatment (Levo 0 mM). A – Cortisol response at 15 min after the acute stress test. B - Cortisol response at 60 min after the acute stress test. C – Cortisol response at 240 min after the acute stress test. Data are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean. The data were compared by means of one-way analysis of variance (ANOVA) at different times (15, 60, and 240 min) followed by Tukey's multiple comparison test.

### 3.2. Experiment 2 – Exposure to AMPT + levodopa/carbidopa

The acute stress protocol increased cortisol levels in zebrafish compared to those in unstressed zebrafish at 15 min after the acute stress test. At the same time point, 0.1 and 0.5 mM did not result in a difference from the stressed control group, whereas the highest concentration maintained the blockade of the stress response (Fig. 1 - A). At 60 and 240 min after stress, cortisol responses returned to the basal level, with difference between stressed and unstressed animals observed only for the 0.1 mM treatment (Fig 1 - B and C).

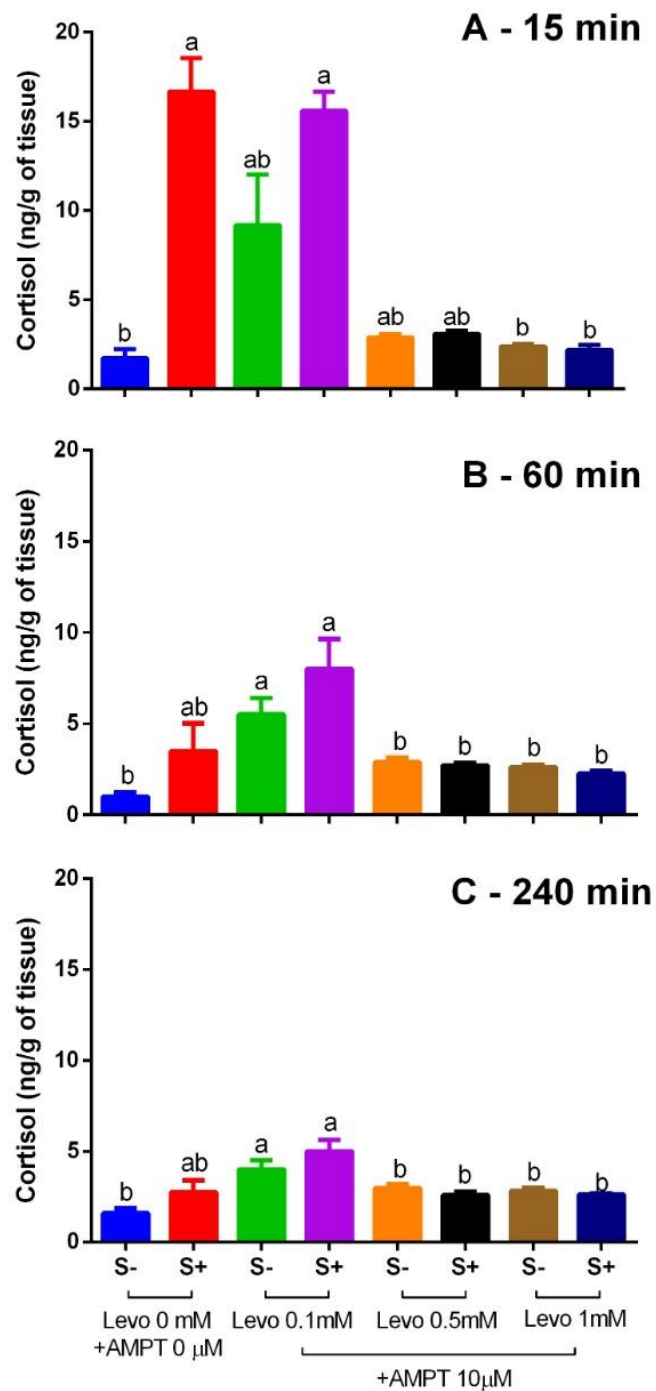


Figure 2 – Concentration of cortisol in zebrafish exposed to AMPT + levodopa/carbidopa treatment or to control treatment (Levo 0 mM + AMPT 0 μM). A – Cortisol response at 15 min after the acute stress test. B - Cortisol response at 60 min after the acute stress test. C - Cortisol response at 240 min after the acute stress test. The data are expressed as the median ± interquartile range. The data were compared using a Kruskal-Wallis analysis at different times (15, 60, and 240 min) followed by a multiple comparison test.

#### 4. Discussion

Here we show that exposure to levodopa alone at the lowest concentration (0.1 mM) at 15 min after stress allowed the fish to respond to the stress stimulus and cause the elevation of cortisol, as well as in the stressed control group. This result was repeated in the second experiment, in which, even after the blockade of CAs with AMPT, the same concentration of levodopa restored the stress response capacity in the fish; the results were not different from the stressed control group.

At the intermediate concentration (0.5 mM) of levodopa, we observed different patterns of response in both experiments. This difference is explored below, and can be explained by the action of both DA and NE on the stress response, as well as the mechanism of action of levodopa. In the first experiment, there was a blockade of the stress response with decreased levels of cortisol at 15 min after stress. We suggested that this concentration of levodopa stimulated NE production and that the catecholamines might be responsible for blockade of the HPA axis. In some species, DA appears to increase when the stress response increases (Enrico et al., 1998; Nakamura and Okada, 1992; Piazza et al., 1996) and NE was related to the decrease in this response (Tuomisto and Männistö, 1985). It is important to note that for the synthesis of NE within the preganglionic vesicles, it is necessary for them to be filled with dopamine (KVETŇANSKÝ et al., 1995), which occurred in this experiment as we did not use drugs that depleted catecholaminergic production and storage.

In the second experiment, we caused exhaustion of the production and storage of CAs in the ganglion vesicles through AMPT, and then we exposed zebrafish to levodopa. In response, we observed that the cortisol levels were similar to those of the stress control group, which allowed the fish to maintain their capacity to respond to

stress. We attributed this result exclusively to the hypothesis of the mechanism of action of the drugs. Levodopa may follow the normal course of action (Cooper et al., 2003; Emilien et al., 1999; Freund et al., 1984) or, because it is exogenous administration, can take place free in the neuronal cytoplasm or be converted into DA in other non-dopaminergic receptors in the brain or glial cells adjacent to DA receptors (Wenning and Geser, 2007). These alternative mechanisms of action may promote the rapid bioavailability of dopamine, even before storage in the lymph node vesicles, and consequently increase the levels in response to stress.

In addition, we also showed that the highest levodopa concentration (1 mM) did not induce any effects in the first experiment, with cortisol levels similar to those the stressed control group. This result was reinforced by the second experiment, in which the HPA axis remained impaired after the blockade of the CAs by AMPT at 15 min after stress. Results such as this, in which different concentrations produce opposite responses, are termed hormesis, and have already been observed in other pharmacological studies (Abreu et al., 2014; Barcellos et al., 2016; Idalencio et al., 2015).

We did not observe any persistent effects at 60 and 240 min of stress, demonstrating that changes in the stress axis occurred only at the earliest time (15 min after stress). Similarly, no changes were observed in the levodopa or AMPT/levodopa treatments in unstressed animals, which suggested that, on their own, the drugs do not influence basal hormone levels, but do modulate the stress response.

More recent studies of levodopa, which have evaluated the dopaminergic pathway and stress, revealed a stimulatory effect on the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, with increased levels of cortisol in short children (Marakaki et al., 2014).



Another study of patients with Parkinson's disease (PD) showed that levodopa administration decreased plasma cortisol concentration (Müller et al., 2007). However, we demonstrated that cortisol values remained within the reference values and that levodopa has been involved in the regulation of stress response and unblocking of the HPA axis, as patients with PD have high levels of cortisol.

In an aggressive behavior test in which fish were submitted to social interaction for 2 days for the detection of dominants and subordinates, it was observed that after the administration of levodopa, cortisol levels decreased compared to those in the control groups that received only vehicle (Höglund et al., 2000). This study took into account the stress caused by the interaction between two fish, which differed from our study, in which the acute stress was induced for 2 min in a group of six individuals for subsequent cortisol analysis, as well as the fish species, drug concentration, and methodology.

In a previous study on the investigation of the role of catecholamines on the stress response (Idalencio et al., 2017), we showed that the catecholaminergic system participated in the adequate production of glucocorticoids in stressful challenges, which has been confirmed through the results presented here. However, in this study, our results strongly suggest that DA was related to the balance of the stress response and that NE was decrease this response. One limitation of our study is related to the complexity of the CA pathway. Numerous dopaminergic and adrenergic receptors are reported in zebrafish, as well as the lack of specificity of the drugs at catecholaminergic receptors.

A further limitation of our study was that our experimental design was unable to precisely determine the role of dopamine in the cortisol response to stress. However,

this did not reduce the relevance of our study in elucidating the role of the dopaminergic system in the regulation of the HPA in fish.

#### Acknowledgements

This work was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil). L.J.G. Barcellos is recipient of CNPq fellowship grant (303263/2018-0).

#### References

- Abreu, M.S. de, Koakoski, G., Ferreira, D., Oliveira, T.A., Rosa, J.G.S. da, Gusso, D., Giacomini, A.C.V., Piato, A.L., Barcellos, L.J.G., 2014. Diazepam and Fluoxetine Decrease the Stress Response in Zebrafish. *PLoS One* 9, e103232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103232>
- Ankenman, R., Salvatore, M.F., 2007. Low Dose Alpha-Methyl-Para-Tyrosine (AMPT) in the Treatment of Dystonia and Dyskinesia. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 19, 65–69. <https://doi.org/10.1176/jnp.2007.19.1.65>
- Barcellos, H.H. de A., Kalichak, F., da Rosa, J.G.S., Oliveira, T.A., Koakoski, G., Idalencio, R., de Abreu, M.S., Giacomini, A.C.V., Fagundes, M., Variani, C., Rossini, M., Piato, A.L., Barcellos, L.J.G., 2016. Waterborne aripiprazole blunts the stress response in zebrafish. *Sci. Rep.* 6, 37612. <https://doi.org/10.1038/srep37612>
- Barton, B.A., 2002. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.* 42, 517–525. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>

- Chrousos, G.P., Gold, P.W., 1992. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 267, 1244–52.
- Cooper, J.R., Bloom, F.E., Roth, R.H., 2003. The biochemical basis of neuropharmacology. Oxford University Press.
- 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 205, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022>
- Emilien, G., Maloteaux, J., Geurts, M., 1999. Dopamine receptors — physiological understanding to therapeutic intervention potential 84, 133–156.
- Enrico, P., Bouma, M., Vries, J.B. De, Westerink, B.H.C., 1998. The role of afferents to the ventral tegmental area in the handling stress-induced increase in the release of dopamine in the medial prefrontal cortex : a dual-probe microdialysis study in the rat brain 205–213.
- Freund, T.F., Powell, J.F., Smith, A.D., 1984. TYROSINE HYDROXYLASE-IMMUNOREACTIVE BOUTONS IN SYNAPTIC CONTACT WITH IDENTIFIED STRIATONIGRAL NEURONS , WITH PARTICULAR REFERENCE TO DENDRITIC SPINES 13, 1189–1215.
- Höglund, E., Balm, P.H.M., Winberg, S., 2000. SKIN DARKENING , A POTENTIAL SOCIAL SIGNAL IN SUBORDINATE ARCTIC CHARR ( SALVELINUS ALPINUS ): THE REGULATORY ROLE OF BRAIN MONOAMINES AND PRO-OPIOMELANOCORTIN-DERIVED PEPTIDES 1721, 1711–1721.
- Idalencio, R., Helena, H., Barcellos, D.A., Kalichak, F., Gabriel, J., Acosta, T., Sander,

M., Abreu, D., Fagundes, M., Dametto, F., Marcheto, L., Maximino, C., Oliveira, D., José, L., Barcellos, G., 2017. General and Comparative Endocrinology a - Methyltyrosine , a tyrosine hydroxylase inhibitor , decreases stress response in zebrafish ( *Danio rerio* ). *Gen. Comp. Endocrinol.* 252, 236–238.

<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.07.012>

Idalencio, R., Kalichak, F., Rosa, S., Acosta, T., 2015. Waterborne Risperidone Decreases Stress Response in Zebrafish 1–10.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140800>

KVETŇANSKÝ, R., PACÁK, K., FUKUHARA, K., VISKUPIČ, E., HIREMAGALUR, B., NANKOVA, B., GOLDSTEIN, D.S., SABBAN, E.L., KOPIN, I.J., 1995. Sympathoadrenal System in Stress. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 771, 131–158. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1995.tb44676.x>

Marakaki, C., Papadimitriou, D.T., Papadopoulou, A., Fretzayas, A., Papadimitriou, A., 2014. &lt;smlcap&gt;L&lt;/smlcap&gt;-Dopa Is a Potent Stimulator of Cortisol in Short Children. *Horm. Res. Paediatr.* 81, 386–390.

<https://doi.org/10.1159/000357268>

Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Dopamine, M.G.C., 2019. Dopamine Receptors : From Structure to Function 78, 189–225.

Müller, T., Welnic, J., Muhlack, S., 2007. Acute levodopa administration reduces cortisol release in patients with Parkinson’s disease. *J. Neural Transm.* 114, 347–350. <https://doi.org/10.1007/s00702-006-0552-0>

NAGATSU, T., LEVITT, M., UDENFRIEND, S., 1964. TYROSINE HYDROXYLASE. THE INITIAL STEP IN NOREPINEPHRINE

BIOSYNTHESIS. *J. Biol. Chem.* 239, 2910–7.

Nakamura, H., Okada, A., 1992. Activation of Cerebral Dopaminergic Systems by Noise and Whole-Body Vibration 18, 10–18.

Oliveira, T.A., Koakoski, G., Kreutz, L.C., Ferreira, D., Rosa, J.G.S. da, de Abreu, M.S., Giacomini, A.C.V., Oliveira, R.P., Fagundes, M., Piato, A.L., Barreto, R.E., Barcellos, L.J.G., 2013. Alcohol Impairs Predation Risk Response and Communication in Zebrafish. *PLoS One* 8, e75780.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075780>

Owens, M., Nemeroff, C., 1993. The role of HLC in the pathophysiology of affective disorders.

Piazza, P.V., Rouge, F.O., Deroche, V., Maccari, S., Simon, H., 1996. Glucocorticoids have state-dependent stimulant effects on the mesencephalic dopaminergic transmission 93, 8716–8720.

Schweitzer, J., Löhr, H., Filippi, A., Driever, W., 2012. Dopaminergic and noradrenergic circuit development in zebrafish. *Dev. Neurobiol.* 72, 256–268.  
<https://doi.org/10.1002/dneu.20911>

Sink, T.D., Lochmann, R.T., Fecteau, K.A., 2008. Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu, and golden shiners. *Fish Physiol. Biochem.* 34, 95–101. <https://doi.org/10.1007/s10695-007-9150-9>

Soares, M.C., Gerlai, R., Maximino, C., 2018. The integration of sociality, monoamines and stress neuroendocrinology in fish models: applications in the 170–191.  
<https://doi.org/10.1111/jfb.13757>

Stednitz, S.J., Freshner, B., Shelton, S., Shen, T., Black, D., Gahtan, E., 2015.

Neurotoxicology and Teratology Selective toxicity of L-DOPA to dopamine transporter-expressing neurons and locomotor behavior in zebra fi sh larvae.

Neurotoxicol. Teratol. 52, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2015.11.001>

Tuomisto, J., Männistö, P., 1985. Neurotransmitter regulation of anterior pituitary hormones. *Pharmacol. Rev.* 37.

Wenning, G., Geser, F., 2007. Multiple System Atrophy, in: Jankovic, J., Tolosa, E. (Eds.), *Parkinson's Disease and Movement Disorders*. Philadelphia, pp. 175–183.

Yamamoto, K., Vernier, P., 2011. The evolution of dopamine systems in chordates 5, 1–21. <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00021>

## 5 DISCUSSÃO

No primeiro artigo (IDALENCIO et. al., 2017), demonstramos que a resposta do eixo de estresse ficou comprometida, uma vez que os peixes-zebra, expostos a AMPT, apresentaram níveis mais baixos de cortisol do que os peixes do controle não expostos, quando expostos a um desafio de estresse agudo. Este resultado deixou claro que os peixes-zebra expostos esgotam suas reservas das CAs, DA ou NE, nas vesículas ganglionares dos respectivos neurônios.

A hidroxilação de L-tirosina é o ponto de regulação e síntese de catecolaminas no SNC, e desta forma a TH é a enzima que limita a síntese de DA e NE (NAGATSU, 1964; LEVITT, 1965). Já o AMPT, por ser um inibidor competitivo da TH, não permitiu a conversão de L-tirosina em L-DOPA e consequentemente DA e NE (WEINER e MOLINOFF, 1989).

Após o resultado do primeiro artigo que trouxe indícios de um mecanismo catecolamina-glicocorticóide, optamos pela utilização da levodopa, um aminoácido pertencente ao grupo das CAs naturalmente disponível na via dopaminérgica. A levodopa é indicada para reposição de DA, de forma exógena, a nível de SNC, tendo em vista sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (REICH & SAVITT, 2019). Para testar a hipótese de envolvimento da levodopa, delineamos os dois experimentos do nosso segundo artigo.

Neste segundo artigo, ampliamos nossa compreensão acerca do envolvimento das CAs com a resposta neuroendócrina do estresse. No primeiro experimento com levodopa isolada, demonstramos um padrão concentração-dependente: em concentração baixa mantém a capacidade de resposta ao estresse, em concentração intermediária bloqueia o eixo HPI e em alta concentração não tem efeito na resposta ao estresse. Estes resultados puderam ser afirmados após a associação de AMPT a levodopa no segundo experimento.

A associação de AMPT e levodopa em concentrações baixa e intermediária devolveram a capacidade de resposta ao estresse, mesmo após bloqueio das CAs com AMPT, isso devido ao mecanismo de ação da levodopa, que pode seguir a rota normal de ação (EMILIEN et al., 1999; COOPER et al., 1996; FREUND et al., 1984) ou devido

a sua administração exógena ficar livre no citoplasma neuronal ou convertida em dopamina em outros neurônios não-dopaminérgicos do cérebro ou células da glia adjacentes aos receptores de DA (POEWE & WENNING, 1998). Esses mecanismos de ação alternativo podem propiciar uma rápida biodisponibilidade de dopamina, antes mesmo do armazenamento na vesícula ganglionar, e conseqüentemente atuação com incremento na resposta ao estresse. Já a concentração alta manteve o bloqueio do eixo HPI e justificada provavelmente pelo efeito hormese, onde diferentes concentrações resultam em diferentes mecanismos de ação, já demonstrado em outros experimentos farmacológicos do nosso grupo (BARCELLOS et al., 2016; IDALENCIO et al., 2015; ABREU, 2014).

Cabe ressaltar que os resultados obtidos em ambos os artigos se referem ao tempo de 15 minutos após o estresse agudo, pois não ocorreu persistência das respostas em 60 e 240 minutos após o estresse. Os fármacos AMPT e levodopa *per se* também não alteraram os níveis de cortisol nos referidos tempos. Obtivemos resultados apenas em peixes submetidos ao estresse, excluindo assim a possibilidade de um feedback negativo.

Evidências sugerem inervação direta catecolaminérgica nos neurônios produtores de CRH no hipotálamo, e esses e outros neurotransmissores parecem influenciar a liberação de CRH (OWEN et al., 1978). O estresse social, durante a formação de uma hierarquia comportamental dominante/subordinado regula a expressão de TH2 no cérebro (PAVLIDIS et al., 2011) e aumenta o nível de dopamina e seus metabolitos (TELES et al., 2013). Enzimas como a TH, DBH e PNMT, sofrem ação de estresse prolongado, através dos glicocorticoides, ACTH e atividade neural.

Em outras espécies a relação catecolaminas/estresse parece estar mais elucidada, ocorrendo aumento da neurotransmissão de dopamina e diminuição de norepinefrina frente as respostas dos glicocorticoides (TUOMISTO & MÄNNISTÖ, 1985). Pesquisas com roedores demonstram tal relação: a introdução de roedores a ambientes novos, provoca aumento da atividade de DA (ENRICO et al., 1998); a administração de corticosterona intraperitoneal, quando em momentos de estresse, aumenta os níveis de dopamina (PIAZZA et al., 1996) e a exposição aguda ao som e a vibração corporal



induzindo ao estresse, demonstram ser regulados pelo sistema dopaminérgico nesta espécie (NAKAMURA et al., 1992).

Estudos com a utilização de levodopa em crianças anãs, demonstraram efeito estimulatório no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), com aumento nos níveis de cortisol (MARAKAKI et al., 2014). Outro estudo de pacientes com doença de Parkinson a levodopa causou diminuição no nível de cortisol (MÜLLER et al., 2007), porém os permanecendo dentro dos valores de referência, provocando mais um equilíbrio na resposta do que um bloqueio do eixo, uma vez que pacientes com doença de Parkinson mantêm níveis elevados de cortisol. Em um teste de comportamento agressivo em interação social observou-se que após a levodopa diminuiu os níveis de cortisol quando comparados aos controles que receberam apenas veículo (HÖGLUND et al., 2000). Este estudo utilizou estresse de natureza social, causado pela interação entre dois peixes, diferente do nosso estudo, onde o estresse agudo foi físico, provocado por dois minutos de intensa perseguição com puçá. Além disso, Höglund e colaboradores usaram o peixe truta do ártico (*Salvelinus alpinus*) como organismo de estudo. Outras diferenças metodológicas como a concentração do fármaco, podem justificar as respostas opostas verificadas em nosso estudo.

Por meio de nossos dois artigos, contribuímos com a elucidação da relação entre as CAs e os glicocorticoides, apresentando fortes indícios de que a DA está relacionada ao equilíbrio da resposta ao estresse e a NE a diminuição desta resposta. A complexidade da via CA, assim como, inúmeros receptores dopaminérgicos e adrenérgicos relatados no peixe-zebra, e a falta de especificidade dos fármacos aos receptores catecolaminérgicos, constituem-se em fatores limitantes para uma conclusão mais afirmativa e definitiva acerca da modulação dopaminérgica do eixo de estresse em peixes.

## 6 CONCLUSÃO

O mecanismo de interação catecolamina-glicocorticóide nas respostas de estresse ficou evidente após a exposição ao AMPT. O bloqueio da síntese de CAs, diminuiu os níveis de cortisol de peixes estressados e a exposição associada de AMPT e levodopa, trouxe fortes indícios de que a DA tenha papel no equilíbrio da resposta ao estresse e a NE diminua esta resposta.

## 7 PERSPECTIVAS

Consideramos que as informações acerca do envolvimento da via dopaminérgica na resposta neuroendócrina do estresse são escassas e que desta forma o aprofundamento nas pesquisas, utilizando o modelo experimental peixe-zebra, se faz necessário para elucidar a relação DOPAMINA x CORTISOL.

Pretendemos aprofundar nossas pesquisas tendo como alvo esta relação dopamina X cortisol, dando continuidade aos estudos publicados com a AMPT e levodopa. Já demonstramos que existe relação entre catecolaminas e glicocorticoides, e que a dopamina parece estar envolvida no equilíbrio da resposta ao estresse, desta forma vamos focar na participação da dopamina anulando o efeito de outras catecolaminas como a norepinefrina.

Nosso próximo ponto a ser elucidado é quantificar a quantidade de dopamina e norepinefrina produzida. Estes resultados complementarão e justificarão os resultados que já obtivemos. Outro ponto interessante é a existência de inúmeros outros fármacos agonistas ou antagonistas e inibidores da recaptação de dopamina, que podem ser utilizados para ampliarmos nosso conhecimento.

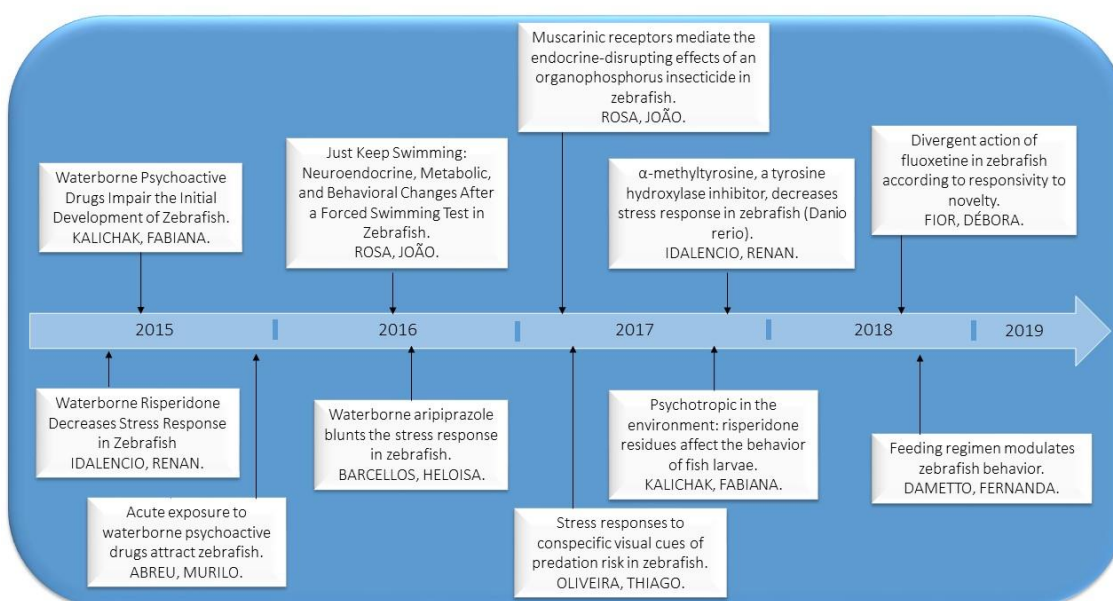
O enfoque deste trabalho foi o eixo neuroendócrino de estresse, por este motivo desenvolvemos nossos experimentos com a resposta ao estresse agudo, avaliada pela mensuração do cortisol. Porém, nada impede de, após elucidar a participação da dopamina nesta resposta, trabalhar também com um eventual efeito comportamental, tendo em vista que a dopamina participa também da cognição e locomoção. Para isso, poderemos utilizar testes como o labirinto em Y, tanque novo, claro e escuro, assim como testes de aprendizagem, interação social, nado forçado, entre outros já parametrizados e amplamente utilizados em peixes-zebra.

Estas perspectivas e tantas outras ideias podem consubstanciar minha futura linha de pesquisa, tendo em vista que a via dopaminérgica, devido sua complexidade e numerosas rotas de ação, se torna um caminho interessante para a pesquisa da fisiologia e farmacologia.

## 8 DEMAIS PUBLICAÇÕES

Nesta seção constam os artigos publicados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Fisiologia de Peixes – UPF. Para melhor compreensão a Figura 8 representa a participação como autor principal e co-autor dos artigos publicados, após início do doutorado em Farmacologia, e posteriormente seus respectivos resumos.

**Figura 1.** Esquema de publicações como autor principal e co-autor, juntamente ao grupo de pesquisa do laboratório de Fisiologia de peixes – UPF, do período de Agosto de 2015 a Abril de 2019.



1º - Kalichak, Fabiana; **Idalencio, Renan**; Rosa, João Gabriel S.; Oliveira, Tiago A De; Koakoski, Gessi; Gusso, Darlan; Abreu, Murilo S De; Giacomini, Ana Cristina V.; Barcellos, Heloísa H.A.; Piatto, Angelo L.; Barcellos, Leonardo J.G. Waterborne Psychoactive Drugs Impair the Initial Development of Zebrafish. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 41, p. 89-94, 2015.

Trabalho principal da dissertação de mestrado em Farmacologia (UFSM) de Fabiana Kalichak. Participei na manutenção dos peixes e aquários, realização dos experimentos e análises morfológicas das larvas, assim como na análise dos resultados. Mostramos que a fluoxetina, o diazepam e a risperidona afetam o desenvolvimento

inicial do peixe-zebra. Todos esses fármacos aumentam a taxa de mortalidade e frequência cardíaca, e diminuem o tamanho das larvas. A risperidona e a fluoxetina diminuem a taxa de eclosão. Esses resultados apontam para um efeito negativo nas fases iniciais do peixe-zebra, visto que a viabilidade larval diminui, promovendo efeitos a nível populacional. Nossa hipótese é de que os ovos e as larvas absorvem os fármacos, exercendo um efeito no sistema nervoso central, tendo implicações no ambiente aquático.

2° - Abreu, Murilo S.; Giacomini, Ana Cristina V.; Gusso, Darlan; Rosa, João G.S.; Koakoski, Gessi; Kalichak, Fabiana; **Idalêncio, Renan**; Oliveira, Thiago A.; Barcellos, Heloísa H.A.; Bonan, Carla D.; Barcellos, Leonardo J.G. Acute exposure to waterborne psychoactive drugs attract zebrafish. *COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY C-TOXICOLOGY & PHARMACOLOGY*, v. 179, p. 37-43, 2015.

Trabalho integrante da tese de doutorado em Farmacologia (UFSM) de Murilo Sander de Abreu. Neste trabalho atuei na manutenção dos animais e experimentos, assim como na análise dos resultados. Mostramos que o teste de aversão através de uma câmara que permite o peixe escapar ou ficar em contato com a água contaminada. Testamos então a aversividade ou preferência por clonazepam, diazepam, fluoxetina, risperidona e bupiriona que podem ser detectadas pelo olfato, visto que os peixes foram submetidos a anosmia, e nesta condição não foram atraídos para o compartimento desses fármacos. Esses achados sugerem que apesar dos efeitos deletérios, estas drogas psicoativas atraem os peixes.

3° - Barcellos, Heloísa Helena De Alcantara; Kalichak, Fabiana; Da Rosa, João Gabriel Santos; Oliveira, Thiago Acosta; Koakoski, Gessi; **Idalêncio, Renan**; De Abreu, Murilo Sander; Giacomini, Ana Cristina Varrone; Fagundes, Michele; Variani, Cristiane; Rossini, Mainara; Piato, Angelo L; Barcellos, Leonardo José Gil. Waterborne aripiprazole blunts the stress response in zebrafish. *Scientific Reports*, v. 6, p. 37612, 2016.

Trabalho integrante da tese de doutorado em Farmacologia (UFSM) de Heloísa Helena de Alcântara Barcellos. Neste trabalho atuei na manutenção dos animais e experimentos, assim como na análise dos resultados. Mostramos a primeira evidência de que o aripiprazol (APPZ) na água enfraquece a resposta ao estresse do peixe exposto em uma concentração dez vezes menor do que a concentração detectada no ambiente. Estes resultados destacam que a presença de resíduos de APPZ no ambiente pode interferir nas respostas de estresse em peixes. Uma vez que uma resposta adequada ao estresse é crucial para restaurar a homeostase dos peixes após estressores, os peixes com resposta ao estresse prejudicada podem ter problemas para lidar com estressores naturais e/ou impostos, com consequências para seu bem-estar e sobrevivência.

4° - Da Rosa, João Gabriel Santos; Barcellos, Heloísa Helena De Alcântara; **Idalencio, Renan**; Marqueze, Alessandra; Fagundes, Michele; Rossini, Mainara; Variani, Cristiane; Balbinoti, Francine; Tietböhl, Tássia Michele Huff; Rosemberg, Denis Brook; Barcellos, Leonardo José Gil. Just Keep Swimming: Neuroendocrine, Metabolic, and Behavioral Changes After a Forced Swimming Test in Zebrafish. Zebrafish (Larchmont, NY), v. 14, p. 51-59, 2016.

Trabalho integrante da tese de doutorado em Farmacologia (UFSM) de João Gabriel Santos da Rosa. Nesse trabalho participei principalmente da realização dos experimentos, extração de cortisol e discussão dos resultados. Mostramos que o vórtex, como uma adaptação do teste de nado forçado pode ser utilizado com modelo de estudo no paradigma exercício-exaustão e recuperação em peixes. Esse teste promove mudanças no funcionamento do eixo HPI, no metabolismo intermediário, assim como no comportamento. Pode ser um protocolo tanto para os estudos ambientais (avaliação dos contaminantes que atuam na mobilização de energia) quanto para estudos de perspectivas translacionais (para avaliar efeitos de fármacos em humanos após exercício ou estressados).

5° - Kalichak, Fabiana; **Idalencio, Renan**; Da Rosa, João Gabriel Santos; Barcellos, Heloísa Helena De Alcântara; Fagundes, Michele; Piato, Angelo; Barcellos, Leonardo José Gil. Psychotropic in the environment: risperidone residues affect the behavior of fish larvae. *Scientific Reports*, v. 7, p. 14121, 2017.

Trabalho integrante da tese de doutorado em Farmacologia (UFSM) de Fabiana Kalichak. Neste trabalho participei desde o processo de reprodução dos peixes para obtenção dos embriões, passando pelos experimentos e análise dos resultados. Expusemos os embriões à risperidona durante os primeiros 5 dias de vida, realizando os testes comportamentais de campo aberto, tigmotaxia e aversividade, no sexto dia de vida. Mostramos que a risperidona causou hiperatividade nas larvas, o que num contexto ambiental, ode torna-la mais vulnerável a predação devido a maior visibilidade pelo predador, ou mesm por sua menor percepção de áreas de risco.

6° - Oliveira, Thiago Acosta; **Idalencio, Renan**; Kalichak, Fabiana; Dos Santos Rosa, João Gabriel; Koakoski, Gessi; De Abreu, Murilo Sander; Giacomini, Ana Cristina Varrone; Gusso, Darlan; Rosemberg, Denis Brook; Barreto, Rodrigo Egydio; Barcellos, Leonardo José Gil. Stress responses to conspecific visual cues of predation risk in zebrafish. *PeerJ*, v. 5, p. e3739, 2017.

Trabalho integrante da tese de doutorado em Farmacologia (UFSM) de Thiago Acosta de Oliveira. Neste trabalho participei da manutenção dos animais, dos experimentos, assim como na análise dos resultados para posterior discussão. Mostramos que cardumes de peixe-zebra visualmente expostos a um predador exibem comportamentos antipredatórios. Além disso, essas manobras defensivas desencadeiam reações antipredatórias em coespecíficos, concomitantemente, estimulam o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal, levando ao aumento do cortisol. Assim, concluímos que os comportamentos defensivos do peixe-zebra atuam como sinais visuais de alarme que induzem a resposta antipredatória e a resposta ao estresse em peixes coepecíficos.

7° - Santos Da Rosa, João Gabriel; Alcântara Barcellos, Heloísa Helena De; Fagundes,

Michele; Variani, Cristiane; Rossini, Mainara; Kalichak, Fabiana; Koakoski, Gessi ; Acosta Oliveira, Thiago; **Idalencio, Renan**; Frandoloso, Rafael; Piato, Angelo L.; José Gil Barcellos, Leonardo. Muscarinic receptors mediate the endocrine-disrupting effects of an organophosphorus insecticide in zebrafish. ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY, v. 32, p. 1964-1972, 2017.

Trabalho integrante da tese de doutorado em Farmacologia (UFSM) de João Gabriel Santos da Rosa. Nesse trabalho participei principalmente na realização dos experimentos e discussão dos resultados. Mostramos que o inseticida a base de metilparation causa desregulação na resposta endócrina de estresse, alterando a expressão de genes da esteroidogênese, especificamente uma diminuição da expressão da StAR, da hsp70 e do POMC. Mostramos também que isto parece ser mediado via receptores muscarínicos, visto que a escopolamina (antagonista muscarínico) bloqueou este efeito.

8° - Fior, Débora; Dametto, Fernanda; Fagundes, Michele; Santos Da Rosa, João Gabriel; Sander De Abreu, Murilo; Koakoski, Gessi; **Idalencio, Renan**; De Alcântara Barcellos, Heloísa Helena; Piato, Angelo; Barcellos, Leonardo José Gil. Divergent action of fluoxetine in zebrafish according to responsivity to novelty. Scientific Reports, v. 8, p. 13908, 2018.

Trabalho principal da dissertação de mestrado em Bioexperimentação (UPF), de Débora Fior. Nesse trabalho participei principalmente dos experimentos e manutenção dos peixes. Mostramos que o teste de reconhecimento do objeto novo pode discriminar o zebrafish em neofóbicos e neofílicos dentro de uma população. E que o zebrafish não mantém o seu comportamento na sequência dos testes e apenas os neofóbicos retornam ao seu comportamento responsivo inicial quando expostos a fluoxetina. Essas diferenças de fenótipos de comportamento podem aumentar a variabilidade da resposta individual, e interferir nas respostas de diversos testes comportamentais. Esses dados reforçam a validade em determinar a personalidade do zebrafish, uma vez que mostramos claramente a diferença na resposta comportamental de zebrafish neofílico e neofóbico submetidos a fluoxetina.



9º - Dametto, Fernanda S.; Fior, Débora; **Idalencio, Renan**; Rosa, João Gabriel S.; Fagundes, Michele; Marqueze, Alessandra; Barreto, Rodrigo E.; Piatto, Angelo; Barcellos, Leonardo J.G. Feeding regimen modulates zebrafish behavior. PeerJ, v. 6, p. e5343, 2018.

Trabalho principal da dissertação de mestrado em Bioexperimentação (UPF), de Fernanda Dametto. Neste trabalho participei da manutenção de aquários, dos experimentos, da análise dos resultados e discussão. Mostramos que o regime de alimentação modula o comportamento do peixe-zebra. Peixes alimentados 3 h antes da avaliação comportamental mostraram atividade reduzida e tendência a uma reação ansiolítica. Peixes alimentados uma vez ao dia apresentaram maior comportamento semelhante à ansiedade. Metabolicamente, peixes alimentados uma vez ao dia apresentaram níveis reduzidos de glicose e glicogênio e aumentaram o lactato quando comparados à alimentação regular (peixes alimentados duas vezes ao dia), sugerindo que o regime alimentar pode modular o metabolismo de carboidratos. Mecanicamente, sugerimos que as alterações metabólicas causadas pelo regime de alimentação podem induzir mudanças comportamentais. Nossos resultados sugerem que a alta variabilidade dos resultados entre diferentes laboratórios pode estar relacionada a diferentes protocolos de alimentação.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M. SD., KOAKOSKI, G., FERREIRA, D., OLIVEIRA, T. A., ROSA, J. G. SD. (2014) Diazepam and Fluoxetine Decrease the Stress Response in Zebrafish. PLoS ONE 9(7): e103232. doi:10.1371/journal.pone.0103232

AIRHART, M., LEE, D. H., WILSON, T. D., MILLER, B. E., MILLER, M. N., SKALKO, R. G., PAUL, J. Adverse effects of serotonin depletion in developing zebrafish. *Monographs in Neurotoxicology and Teratology* 34 (2012) 152–160.

BARBAZUK WB, KORF I, KADAVI C, HEYEN J, TATE S, WUN E. (2000) The synthetic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res* 10: 1351–1358. pmid:10984453 doi: 10.1101/gr.144700

BARCELLOS LJG, RITTER F, KREUTZ LC, QUEVEDO RM, SILVA LB, BEDIN AC. (2007) Whole body cortisol increases after direct and visual contact with the predator in zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture* 272: 774–778. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.09.002

BARCELLOS LJG, RITTER F, KREUTZ LC, CERICATO L. (2010) Can Zebrafish *Danio rerio* learn about predation risk? The effect of a previous experience on the cortisol response in subsequent encounters with a predator. *J Fish Biol* 76: 1032–1038. doi: 10.1111/j.1095-8649.2010.02542.x

BARCELLOS, H.H. DE A., KALICHAK, F., DA ROSA, J.G.S., OLIVEIRA, T.A., KOAKOSKI, G., IDALENCIO, R., DE ABREU, M.S., GIACOMINI, A.C.V., FAGUNDES, M., VARIANI, C., ROSSINI, M., PIATO, A.L., BARCELLOS, L.J.G., 2016. Waterborne aripiprazole blunts the stress response in zebrafish. *Sci. Rep.* 6, 37612. <https://doi.org/10.1038/srep37612>

BARTON, Bruce A.; IWAMA, George K. Physiological Changes in Fish From Stress in Aquaculture With Emphasis on the Response. *Annual Reviews of Fish Diseases*, [s. l.], n. 6, p. 3–26, 1991.

BEAR, M. F., CONNORS, B. W., PARADISO, M. A. *Neurociências: desvendando o Sistema nervosa*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

BLANCHARD, D. C., BLANCHARD, R. J. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annu Rev Psychol.* 1988;39:43-68.

BOEHMLER, W., PETKO, J., CANFIELD, V.E LEVENSON, R. ( 2013 ) Estratégias de genômica para a identificação de genes receptor de dopamina no peixe-zebra . Em *Dopamina* ( Kabbani, N. , ed), pp. 201 - 214 ,Humana Press , Nova Iorque.

BONGA, W.S.E. The stress response in fish. *Physiol Rev.* 1997;77(3):591- 625.

CACHAT J, STEWART A, GROSSMAN L, GAIKWAD S, KADRI F, CHUNG KM. (2010) Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nature Prot* 5(11): 1786–1799. doi: 10.1038/nprot.2010.140

CADONI, C., SOLINAS, M., VALENTINI, V., DI CHIARA, G. (2003). Selective psychostimulant sensitization by food restriction: differential changes in accumbens shell and core dopamine. *Eur J Neurosci* 18: 2326–2334

CHEN, Y. C., PRIYADARSHINI, M., PANULA, P. (2009) Complementary developmental expression of the two tyrosine hydroxylase transcripts in zebrafish. *Histochem Cell Biol* 132:375–381.

CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The Concepts of Stress and stress System Disorders. Overview of Physical and Behavioral Homeostasis. *JAMA*, v. 9, 1992.

COOPER, J. R., BLOOM, F. E., ROTH, R. H. The biochemical basis of neuropharmacology. 7th. Ed. New York/Oxford, Oxford University Press, 1996:293-351.

CORVOL JC, MARIANI LL. Perspectivas terapêuticas e farmacológicas na doença de Parkinson. *Rev Prat.* 2018 de maio; 68 (5): 515-519.

CUADRA, G., ZURITA, A., GIOINO, G., MOLINA, V. (2001). Influence of different antidepressant drugs on the effect of chronic variable stress on restraint-induced dopamine release in frontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 25: 384–394.

DAHM R, GEISLER R. Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Mar Biotechnol (NY)*. 2006;8(4):329-45.

EBADA MA, ALKANJ S, M EBADA, ABDELKARIM AH, DIAB A, AZIZ MAE, SOLIMAN AM, FAYED N, BAHBAH EI, Negociação A. Segurança e baixa de Levetiracetam para o Tratamento da Discinesia por Levodopa em Doentes com Doença de Parkinson: Uma revisão sistemática. *Alvos de drogas do CNS Neurol Disord.* 2019.

EGAN R, BERGNER CL, HART PC, CACHAT JM, CANAVELLO PR, ELEGANTE MF. (2009) Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res* 205: 38–44 doi: 10.1016/j.bbr.2009.06.022. pmid:19540270

EK, F., MALO, M., ANDERSSON, M. A., WEDDING, C., KRONBORG, J., SVENSSON, P., WATERS, S., PETERSSON, P. AND OLSSON. R. Behavioral Analysis of Dopaminergic Activation in Zebrafish and Rats Reveals Similar Phenotypes. *ACS Chemical Neuroscience* 2016 7 (5), 633-646 DOI: 10.1021/acscemneuro.6b00014

EMILIEN, G., MALOTEAUX, J. M., GEURTS, M., HOOGENBERG, K., CRAGG, S. 1999. Dopamine receptors—physiological understanding to therapeutic intervention potential. *Pharmacol Ther* 84: 133–156.

ENGELMAN, K.; PORTNOY, B.; LOVENBERG, W. A sensitive and specific doubleisotope derivative method for the determination of catecholamines in biological specimens. *Am J Med Sci*, v. 255, p. 259-68, Apr 1968.

ENRICO, P.; BOUMA, M.; VRIES, J.; WEXTERINK, B. The role of afferents to the ventral tegmental área in the handling stress-induced increase in the release of dopamine in the medial pré-frontal córtex: a dual-probe microdialysis study in the rat brain. *Brain Research*. V. 779, p. 205-13, 1998.

FRANCO, ANDRÉ SILVA. Manual de farmacologia. Editor: José Eduardo Krieger. Barueri, SP: Manole, 2016.

FREUND, T. F., POWELL, J. F., SMITH, A. D. Tyrosine hydroxylaseimmunoreactive boutons in synaptic contac with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neurosci* 1984; 13:1189-215.

GERLAI, R., LAHAV, M., GUO, S., ROSENTHAL, A. (2000) Drinks like a fish: zebrafish (*Danio rerio*) as abehavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav* 67: 773–782. pmid:11166068 doi: 10.1016/s0091-3057(00)00422-6

GIACOMINI, A. C. V. V., ABREU, M. S., GIACOMINI, L. V., SIEBEL, A. M., ZIMERMAN, F. F., RAMBO, C. L., MOCELIN, R., BONAN, C. D., PIATO, A. L., BARCELLOS, L. J. G. Fluoxetine and diazepam acutely modulate stress induced-behavior. *Behavioural brain research*, v. 296, p. 301-310, 2016.

GRAEFF, F. G. Ansiedade, pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. 2007;29:s3-s6

GOLDSMITH P (2004) Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol* 4: 504–12. pmid:15351356 doi: 10.1016/j.coph.2004.04.005

GRANNER, D.K. Hormones of the Adrenal Cortex. In: Murray RB, Granner DK, Mayes PA, Rowell VW (25<sup>o</sup>ed). *Harper's Biochemistry*. Stanford: Appleton & Lange, 2000.

HÖGLUND, E., BALM, P.H.M., WINBERG, S., 2000. Skin darkening , a potential social signal in subordinate arctic charr ( *salvelinus alpinus* ): the regulatory role of brain monoamines and pro-opiomelanocortin-derived peptides 1721, 1711–1721.

HONTELA, A. Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: In vivo and in vitro assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1998;17(1):44-8.

HOUT, P. Pharmacological properties of levodopa. In: FOX, S.H.; BROTHIE, J.M. (Ed). Levodopa-induced Dyskinesia in Parkinson's Disease. London: Springer-Verlag, 2014.

IDALENCIO, R., KALICHAK, F., ROSA, J. G. S., OLIVEIRA, T. AD., KOAKOSKI, G., GUSSO, D. (2015) Waterborne Risperidone Decreases Stress Response in Zebrafish. PLoS ONE 10(10): e0140800. doi:10.1371/journal.pone.0140800.

IDALENCIO, R., HELENA, H., BARCELLOS, D.A., KALICHAK, F., GABRIEL, J., ACOSTA, T., SANDER, M., ABREU, D., FAGUNDES, M., DAMETTO, F., MARCHETO, L., MAXIMINO, C., OLIVEIRA, D., JOSÉ, L., BARCELLOS, G., 2017. General and Comparative Endocrinology a -Methyltyrosine , a tyrosine hydroxylase inhibitor , decreases stress response in zebrafish ( Danio rerio ). Gen. Comp. Endocrinol. 252, 236–238. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.07.012>

IRONS, T. D., KELLY, P. E., HUNTER, D. L., MACPHAIL, R. C. E PADILLA, S. ( 2013 ) A administração aguda de drogas dopaminérgicas tem efeitos diferenciais sobre a locomoção no peixe-zebra larval Pharmacol., Biochem. Behav 103 , 792 - 813 , DOI: 10.1016 / j.pbb.2012.12.010

KHAN, K. M., COLLIER, A. D., MESHALKINA, D. A., KYSIL, E. V., KHATSKO, S. L., KOLESNIKOVA, T., ECHEVARRIA, D. J. (2017). Zebrafish models in neuropsychopharmacology and CNS drug discovery. British journal of pharmacology, 174(13), 1925–1944. doi:10.1111/bph.13754

KALUEFF, A. V., GEBHARDT, M., STEWART, A. M., CACHAT, J. M., BRIMMER, M., CHAWLA, J. S., SCHNEIDER, H. (2013). Towards a Comprehensive Catalog of Zebrafish Behavior 1.0 and Beyond. Zebrafish, 10(1), 70–86. <http://doi.org/10.1089/zeb.2012.0861>

KREUTZ, L.C. Acute toxicity testing of agricultural pesticides on silver catfishes (*Rhamdia quelen*), fingerlings. *Ciência Rural*, v. 38, p. 1050–1055, 2008.

LEVITT, M., SPCTOR, S., SJOERDSMA, A., UDENFRIEND, S. Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart. *J Pharmacol Exp Ther* 1965; 23:1493-501.

MARAKAKI, C., PAPADIMITRIOU, D.T., PAPADOPOULOU, A., FRETZAYAS, A., PAPADIMITRIOU, A., 2014. <math>L\text{-Dopa}</math> Is a Potent Stimulator of Cortisol in Short Children. *Horm. Res. Paediatr.* 81, 386–390. <https://doi.org/10.1159/000357268>

MARGIS, R., PICON, P., COSNER, A. F., SILVEIRA, R. O. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. *Rev. psiquiatr. Rio Gd. Sul* [online]. 2003, vol.25, suppl.1, pp.65-74. ISSN 0101-8108. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81082003000400008>.

MAXIMINO, C. E HERCULANO, A. M. (2010) Uma revisão de monoaminérgico Neuropsychopharmacology em Zebrafish Zebrafish 7 , 359 - 378 , DOI: 10,1089 / zeb.2010.0669

MISSALE, C., NASH, S. R., ROBINSON, S. W., JABER, M., CARON, M. G. 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78: 189–225.

MOMMSEN, Thomas P.; VIJAYAN, Mathilakath M.; MOON, Thomas W. Cortisol in Teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, [s. l.], v. 9, p. 211–268, 1999.

MRZLJAK, L., BERGSON, C., PAPPY, M., HUFF, R., LEVENSON, R. E GOLDMAN-RAKIC, P. S. (1996) Localização da dopamina receptores D4 nos neurônios GABAérgicos do cérebro dos primatas . *Nature* 381 , 245 – 8.

MÜLLER, T., WELNIC, J., MUHLACK, S., 2007. Acute levodopa administration reduces cortisol release in patients with Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* 114, 347–350. <https://doi.org/10.1007/s00702-006-0552-0>

NAGATSU, T., LEVITT, M., UDERFRIEND, S. Tyrosine hydroxylase: the initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem* 1964; 239:2910-7.

NAKAMURA, H.; MOROGI, T.; NOHARA, S.; NAKAMURA, H.; OKADA, A. Activation of cerebral dopaminergic systems by noise and whole-body vibration. *Environmental Research*. V. 10, n. 18, 1992.

OLIVEIRA, T. A., KOAKOSKI, G., KREUTZ, L.C., FERREIRA, D. (2013) Alcohol Impairs Predation Risk Response and Communication in Zebrafish. *PLOS ONE* 8(10):e75780. doi:10.1371/journal.pone.0075780.

O'LEARY, O.F., BECHTHOLT, A.J., CROWLEY, J.J., HILL, T.E., PAGE, M.E., LUCKI, I., 2007. Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology (Berl)*. 192, 357–371. <https://doi.org/10.1007/s00213-007-0728-9>

OSWALD, L. M., WONG, D. F., MCCAUL, M., ZHOU, Y., KUWABARA, H., CHOI, L., BRASIC, J., AND WAND, G. S. Relationships Among Ventral Striatal Dopamine Release, Cortisol Secretion, and Subjective Responses to Amphetamine. *Neuropsychopharmacology* (2005) 30, 821–832, advance online publication, 9 February 2005; doi:10.1038/sj.npp.1300667

OWEN, F., CROW, T. J., POULTER, M., CROSS, A. J., LONGDEN, A., RILEY, G. J. Originally published as Volume 2, Issue 8083 INCREASED DOPAMINE-RECEPTOR SENSITIVITY IN SCHIZOPHRENIA, *The Lancet*, Volume 312, Issue 8083, 1978, Pages 223-226, ISSN 0140-6736, .

PACHECO, M., SANTOS, M. A. Biotransformation, endocrine, and genetic responses

of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2001;49(1):64-75.

PANULA, P., CHEN, Y.C., PRIYADARSHINI, M., KUDO, H., SEMENOVA, S., SUNDEVIK, M., SALLINEN, V. (2010). A neuroanatomia comparativa e neuroquímica de sistemas do SNC peixe-zebra de relevância para doenças neuropsiquiátricas humanos *Neurobiol. Dis.* 40 , 46 - 57 , DOI: 10.1016 / j.nbd.2010.05.010.

PARIANTE, C. M., MILLER, A. H. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry.* 2001;49(5):391-404.

PAVLIDIS, M., SUNDEVIK, M., CHEN, Y. C., PANULA, P. (2011) Adaptive changes in zebrafish brain in dominant-subordinate behavioral context. *Behav Brain Res* 225:529–537.

PIATO AL, CAPIOTTI KM, TAMBORSKI A, OSES JP, BARCELLOS LJG, BOGO MR. (2011) Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses. *Progr Neuro-Psychopharm Biol Psychiatry* 35: 561–567. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.12.018

PIAZZA, P.V., ROUGE-PONT, F., DEROCHE, V., MACCARI, S., SIMON, H., LE MOAL, M. (1996) Glucocorticoids have state-dependent stimulant effects on the mesencephalic dopaminergic transmission. *Proc Natl Acad Sci USA*93: 8716–8720.

PREDIGER, R.D. et al. Dopaminergic neurons in Parkinson's disease. In: KOSTRZEWA, R.M. (Ed) *Handbook of Neurotoxicity*. New York: Springer Science, 2014.

REICH SG, SAVITT JM. Mal de Parkinson. *Med. Clin. North Am.* 2019 mar; 103 (2): 337-350.

ROMAGNOLO A, MEROLA A, ARTUSI CA, RIZZONE MG, ZIBETTI M, Neuropatia Induzida por Loperidol. *Levodopa: Uma Revisão Sistemática. Mov Disord Clin Pract.* 2019 fev; 6 (2): 96-103.

RICCI, A.F., ROSSODIVITA, I., AVOLA, R., TAYIEBATI, S.K. The dopaminergic system in hypertension. *Clin Exp Hipertens* 2001; 23: 15-24.

RINK, E., AND WULLIMANN, M. F. (2001). The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum). *Brain Res.* 889, 316–330.

SEMENOVA, S. A., CHEN, Y. C., ZHAO, X., RAUVALA, H., PANULA, P. The tyrosine hydroxylase 2 (TH2) system in zebrafish brain and stress activation of hypothalamic cells. *Histochem Cell Biol.* 2014 Dec;142(6):619-33. doi: 10.1007/s00418-014-1240-z. Epub 2014 Jul 16.

SETINI, A., PIERUCCI, F., SENATORI, O., NICOTRA, A. Molecular characterization of monoamine oxidase in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. Volume 140, Issue 1, January 2005, Pages 153–161. doi:10.1016/j.cbpc.2004.10.002

SIDHU, A., NIZNIK, N. Z. Coupling of dopamine receptor subtypes to multiple and diverse G proteins. *Int J Dev Neurosci* 2000; 18: 669-677.

SINK, T.D., LOCHMANN, R.T., FECTEAU, K.A. Validation, use, and disadvantages of enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of cortisol in channel catfish, largemouth bass, red pacu and golden shiners. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 75, p. 165-171, 2007.

SPENCE R, GERLACH G, LAWRENCE C, SMITH C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2008;83(1):13-34.

STEELE, S. L., EKKER, M., PERRY, S. F. (2011) Interactive effects of development and hypoxia on catecholamine synthesis and cardiac function in zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Physiol B* 181:527–538.

TELES, M. C., DAHLBOM, S. J., WINBERG, S., OLIVEIRA, R. F. (2013) Social modulation of brain monoamine levels in zebrafish. *Behav Brain Res* 253:17–24. doi:10.1016/j.bbr.2013.07.012.

TUOMISTO, J., MÄNNISTÖ, P., 1985. Neurotransmitter regulation of anterior pituitary hormones. *Pharmacol. Rev.* 37.

VILHENA, R. DE O., PONTES, F.L.D., MARSON, B.M., RIBEIRO, R.P., CARVALHO, K.A.T. DE, CARDOSO, M.A., PONTAROLO, R., 2014. A new HILIC-MS/MS method for the simultaneous analysis of carbidopa, levodopa, and its metabolites in human plasma. *J. Chromatogr. B* 967, 41–49. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2014.06.030>

WATANABE, T., TAGUCHI, Y., SHIOSAKA, S., TANAKA, J., KUBOTA, H., TERANO, Y., TOHYAMA, M., WADA, H. Distribution of the histaminergic neuron system in the central nervous system of rats; a fluorescent immunohistochemical analysis with histidine decarboxylase as a marker, *Brain Research*, Volume 295, Issue 1, 12 March 1984, Pages 13-25, ISSN 0006-8993, [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90811-4](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(84)90811-4).

WEINER, N., MOLINOFF, P. B. Catecholamines. En: Siegel GJ, Agranoff B, Albers RW, Molinoff PB eds. *Basic Neurochemistry*. 4th Ed. New York: Raven Press; 1989. p. 233-51.

WESTLUND, K. N., DENNEY, R. M., KOCHERSPERGER, L. M., ROSE, R. M., AND ABELL, C. W. (1985). Distinct monoamine oxidase A and B populations in primate brain. *Science* 230, 181–183.



WILLIAMS, G. V. E GOLDMAN-RAKIC, P. S. (1995). Modulação de campos de memória por receptores D1 de dopamina no córtex pré-frontal . *Nature* 376 , 572 - 5 .

YAMAMOTO, K., VERNIER, P. The evolution of dopamine systems in chordates. Institute of Neurobiology Alfred Fessard, CNRS, Gif-sur-Yvette, France. *Front. Neuroanat.*, 29 March 2011.



YAMAMOTO, K., RUUSKANEN, J. O., WULLIMANN, M. F., AND VERNIER, P. (2010). Two tyrosine hydroxylase genes in vertebrates: comparative distribution with other monoaminergic markers in the zebrafish brain. *Mol. Cell Neurosci.* 43, 394–402.

YAMAMOTO K, FONTAINE R, PASQUALINI C, VERNIER P. Classification of Dopamine Receptor Genes in Vertebrates: Nine Subtypes in Osteichthyes. *Brain Behav Evol* 2015;86:164-175

YANG L, HO NY, ALSHUT R, LEGRADI J, WEISS C, REISCHL M. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reprod Toxicol.* 2009;28(2):245-53.

## 10 ANEXO

Parecer emitido pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Passo Fundo CEUA-UPF.

		<b>UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO</b> <b>VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO</b> <b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA</b>	
<b>CERTIFICADO</b>			
<p>Cerificamos que a proposta intitulada "Modulação dopaminérgica sobre a resposta de estresse em peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>)" registrada com o nº 024/2016, sob a responsabilidade de <b>Leonardo José Gil Barcellos</b>, e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos) para fins de ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi <b>aprovado</b> pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO (CEUA-UPF), em reunião de 12/08/2016.</p>			
Finalidade: Pesquisa		Vigência da autorização: 12/08/2016 a 01/08/2019	
Espécie/linhagem/raça: <i>Danio rerio/ wild type</i>		Nº de animais: 1.296	Peso/idade: 0,5 g / 1 ano
Sexo: Machos		Origem: Laboratório de fisiologia de peixes – FAMV - UPF	
<p>Resumo:</p> <p>O experimento será realizado no Laboratório de Fisiologia de Peixes da Universidade de Passo Fundo (LFP-UPF). Testando a hipótese de que a modulação da via dopaminérgica interfere no eixo neuroendócrino hipotálamo-hipófise-interrenal (HPI) (receptor dopaminérgico bloqueado aumenta a resposta ao estresse) em peixes-zebra submetidos a um teste de estresse.</p>			
<p>Passo Fundo, 12 de agosto de 2016.</p>			
 Profa. Dra. Ana Cristina Vendrametto Varrone Giacomini Coordenadora – CEUA – UPF			