

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

Francini Franscescon

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DA TAURINA EM
FENÓTIPOS COMPORTAMENTAIS E NEUROENDÓCRINOS
ASSOCIADOS À ESQUIZOFRENIA EM PEIXES-ZEBRA**

Santa Maria, RS, Brasil

2022

Francini Francescon

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DA TAURINA EM
FENÓTIPOS COMPORTAMENTAIS E NEUROENDÓCRINOS ASSOCIADOS À
ESQUIZOFRENIA EM PEIXES-ZEBRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica do Centro de Ciências Naturais e Exatas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Orientador: Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg

Santa Maria, RS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Franscescon, Francini
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DA TAURINA EM
FENÓTIPOS COMPORTAMENTAIS E NEUROENDÓCRINOS ASSOCIADOS À
ESQUIZOFRENIA EM PEIXES-ZEBRA / Francini Franscescon.-
2022.
80 p.; 30 cm

Orientador: Denis Broock Rosemberg
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2022

1. esquizofrenia 2. MK-801 3. peixes-zebra 4. taurina
I. Broock Rosemberg , Denis II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, FRANCINI FRANSCESCON, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Francini Franscescon

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DA TAURINA EM FENÓTIPOS
COMPORTAMENTAIS E NEUROENDÓCRINOS ASSOCIADOS À ESQUIZOFRENIA
EM PEIXES-ZEBRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica do Centro de Ciências Naturais e Exatas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

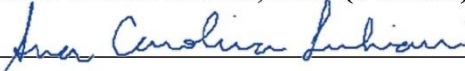
Aprovada em 11 de março de 2022



Denis Broock Rosemberg, Dr. (UFSM) - Videoconferência
(Presidente/Orientador)



Carla Denise Bonan, Dra. (PUCRS) - Videoconferência



Ana Carolina Luchiari, Dra. (UFRN) - Videoconferência



Anna Maria Siebel, Dra. (UNOCHAPECÓ) - Videoconferência



Maribel Antonello Rubin, Dra. (UFSM) - Videoconferência

Santa Maria, RS
2022

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma permitiram que essa tese se concretizasse.

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador, Denis, pela oportunidade concedida, por ter acreditado na minha capacidade, e por sempre ter proporcionado momentos de crescimento e conhecimento. Também gostaria de agradecer a todos os colegas de laboratório, que se tornaram grandes amigos, os quais compartilharam não apenas dias de experimentos, mas também as horas de lazer. Às amigas e colegas meu muito obrigada pela amizade, pelo conhecimento compartilhado, e por todos os momentos que passamos juntas.

Agradeço à minha família, em especial meus pais, minhas irmãs Tatiane e Heloisa e meus avós, pessoas as quais, sempre pude contar, que sempre me incentivaram a estudar e a buscar meus sonhos, e que não mediram esforços para que isso fosse possível.

Agradeço ao meu namorado e parceiro de vida Jucimar Padoan, pelo apoio, carinho, e compreensão concedida nessa etapa crucial da minha vida e carreira profissional.

Agradeço a todos os professores e pesquisadores que contribuíram para minha formação, certamente guardo os ensinamentos recebidos e tenho um carinho especial por todos.

Para concluir, agradeço aos órgãos de fomento, CAPES obrigada pela bolsa, CNPq e tantos outros. Agradeço a UFSM pela estrutura e educação científica concedida. Muito obrigada UFSM, pois tenho orgulho de ter realizado meu doutorado nessa instituição tão qualificada e importante para nosso País.

“O desejo profundo da humanidade pelo conhecimento é justificativa suficiente para nossa busca contínua.”

Stephen Hawkin

RESUMO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DA TAURINA EM FENÓTIPOS COMPORTAMENTAIS E NEUROENDÓCRINOS ASSOCIADOS À ESQUIZOFRENIA EM PEIXES-ZEBRA

AUTORA: Francini Franscescon
ORIENTADOR: Denis Broock Rosemberg

A esquizofrenia é uma doença neuropsiquiátrica crônica que compreende um complexo conjunto de sintomas, os quais representam um desafio para seu estudo. Uma das principais estratégias experimentais para obtenção de fenótipos relacionados à esquizofrenia envolve o uso da dizocilpina (MK-801), a qual é um antagonista dos receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA). No campo da neuropsiquiatria, diversos estudos têm sido realizados visando encontrar moléculas potencialmente neuroprotetoras que possam prevenir os efeitos do MK-801. A taurina é um β -aminoácido sulfurado a qual exerce papel multifuncional no sistema nervoso central (SNC), sendo considerada uma molécula neuroprotetora. Neste trabalho, analisamos o potencial neuroprotetor da taurina em fenótipos comportamentais e neuroendócrinos associados à esquizofrenia em peixes-zebra. Dessa forma, o caráter neuroprotetor da taurina foi avaliado frente a alterações em diferentes domínios comportamentais modificados pelo MK-801 em peixes-zebra. No primeiro artigo, inicialmente testamos os efeitos de diferentes doses de MK-801 (0,1, 0,3, 0,5, 1 e 2 mg/kg), mostrando que o MK-801 2 mg/kg foi capaz de replicar alterações comportamentais (*e.g.* hiperlocomoção e déficit cognitivo) reportados previamente na literatura. A partir disso, mostrou-se que o pré-tratamento com taurina (42 e 150 mg/L) preveniu o déficit cognitivo induzido pelo MK-801 2 mg/kg no teste da esQUIVA INIBITÓRIA. Além do mais, o tratamento com taurina 400 mg/L preveniu a hiperlocomoção e alterações na exploração vertical desencadeadas pelo MK-801 no teste do tanque novo. No segundo estudo, investigamos o efeito da taurina e MK-801 no comportamento social e níveis de cortisol do peixe-zebra. Nesse caso, observou-se que o pré-tratamento com taurina preveniu alterações no padrão de dispersão do cardume, restabelecendo parte das alterações na sociabilidade induzidas pelo MK-801. Com relação aos níveis de cortisol, demonstrou-se que o pré-tratamento com taurina 400 mg/L aboliu a redução nos níveis de cortisol do corpo inteiro induzida pelo MK-801. Em conclusão, o papel neuroprotetor da taurina em fenótipos comportamentais associados à esquizofrenia em peixes-zebra foi destacado, sendo os efeitos da taurina dependentes da concentração testada e fenótipo avaliado. Contudo, nossos resultados reforçam a adequabilidade do peixe-zebra no estudo de substâncias neuroprotetoras com potencial para reduzir a excitotoxicidade de glutamato em pesquisas em neurociência translacional.

Palavras-chave: Neuroproteção. Excitotoxicidade glutamatérgica. Taurina. Esquizofrenia. Cortisol. *Danio rerio*.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE NEUROPROTECTIVE POTENTIAL OF TAURINE IN BEHAVIORAL AND NEUROENDOCRINAL PHENOTYPES ASSOCIATED WITH SCHIZOPHRENIA IN ZEBRAFISH

AUTHOR: Francini Franscescon
ADVISOR: Denis Broock Rosemberg

Schizophrenia is a chronic neuropsychiatric disease that comprises a complex set of symptoms, which represent a challenge for its study. One of the main experimental strategies for obtaining phenotypes related to schizophrenia involves the use of dizocilpine (MK-801), which is an antagonist of N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamatergic receptors. In the field of neuropsychiatry, several studies have been carried out to find potentially neuroprotective molecules that can prevent the effects of MK-801. Taurine is a sulfur-containing β -amino acid which plays a multifunctional role in the central nervous system (CNS), being considered a neuroprotective molecule. In this work, we analyze the neuroprotective potential of taurine in behavioral and neuroendocrine phenotypes associated with schizophrenia in zebrafish model. Thus, the neuroprotective role of taurine was evaluated against changes in different behavioral domains altered by MK-801 in zebrafish. In the first article, we initially tested the effects of different doses of MK-801 (0.1, 0.3, 0.5, 1 and 2 mg/kg), showing that 2 mg/kg MK-801 was able to replicate behavioral changes (*e.g.*, hyperlocomotion and cognitive impairment) previously reported in the literature. It was shown that taurine pretreatment (42 and 150 mg/L) prevented MK-801-induced cognitive impairment on inhibitory avoidance task. Furthermore, 400 mg/L taurine prevented hyperlocomotion and changes in vertical exploration triggered by MK-801 in the novel tank test. In the second study, we investigated the effect of taurine and MK-801 on social behavior and cortisol levels. In this case, it was observed that taurine pretreatment prevented the disruption of the shoal area, thus restoring in part the alterations in the sociability induced by MK-801. Regarding cortisol levels, 400 mg/L taurine pretreatment abolished MK-801-induced reduction whole-body cortisol levels. In conclusion, the neuroprotective role of taurine in schizophrenia-like phenotypes in zebrafish was highlighted, being taurine effects dependent on the concentration tested and of the phenotype evaluated. However, our results reinforce the suitability of zebrafish to investigate neuroprotective substances with potential to reduce glutamate excitotoxicity in translational neuroscience research.

Keywords: Neuroprotection. Glutamate excitotoxicity. Taurine. Schizophrenia. Cortisol. *Danio rerio*.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABD	Domínio de ligação do agonista, do inglês “ <i>agonist binding domain</i> ”
AChE	Acetilcolinesterase
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ATP	Adenosina trifosfato
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
BAX	do inglês “ <i>BCL-2 associated protein X</i> ”
BCL-2	do inglês “ <i>B-cell lymphoma protein 2</i> ”
CAS descarboxilase	Cisteína ácido sulfínico descarboxilase
CPF	Córtex pré-frontal
CTD	Domínio C-terminal, do inglês “ <i>C-terminal domain</i> ”
CUMS	Estresse crônico leve e imprevisível
EFSA	Autoridade de Segurança Alimentar Europeia, do inglês “ <i>European Food Safety Authority</i> ”
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular, do inglês “ <i>extracellular signal regulated kinase</i> ”
GPx	Glutathiona peroxidase
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAD67	Glutamato descarboxilase
HPA	Eixo hipotalâmico-pituitária-adrenal
HPI	Eixo hipotalâmico-pituitária-interrenal
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês “ <i>high performance liquid chromatography</i> ”
i.p.	Intraperitoneal
iTauR	Receptores ionotrópicos de taurina
KA	Receptor cainato
LSD	Dietilamida do ácido lisérgico, do inglês “ <i>lysergic acid diethylamide</i> ”
LTP	Potenciação de longa duração, do inglês “ <i>long-term potentiation</i> ”
MDA	Malondialdeído
MK-801	Dizocilpina
mTauR	Receptores metabotrópicos de taurina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NPSH	Tióis não proteicos, do inglês “ <i>non-protein thiols</i> ”
NTD	Domínio N-terminal, do inglês “ <i>N-terminal domain</i> ”
ON	Óxido nítrico
PC	Proteínas carboniladas
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
TauT	Transportador específico de taurina
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TMD	Domínio transmembrana, do inglês “ <i>transmembrane domain</i> ”
SA	Substância de alarme
s.c.	subcutânea
PCP	Fenciclidina
ρCPA	ρ-chlorophenylalanine
VTA	Área tegmental ventral, do inglês “ <i>ventral tegmental area</i> ”

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Hipofunção dos receptores NMDA e os sintomas positivos e negativos da esquizofrenia.....16
- Figura 2.** Ilustração do receptor NMDA, contendo sítios de ligação de antagonistas, agonistas e outras moléculas com ação modulatória.....18
- Figura 3.** Rota de biossíntese da taurina a partir dos aminoácidos metionina e cisteína.....26
- Figura 4.** Esquema representativo dos testes comportamentais realizados e dos principais achados desta tese.....60

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO.....	12
2. INTRODUÇÃO.....	13
2.1. A ESQUIZOFRENIA.....	13
2.2. O RECEPTOR N-METIL-D-ASPARTATO (NMDA).....	17
2.3. O PEIXE-ZEBRA COMO ORGANISMO MODELO.....	18
2.4. O MK-801 COMO MODELO FARMACOLÓGICO DE ESQUIZOFRENIA.....	21
2.5. O MK-801 E SEUS EFEITOS BIOLÓGICOS: ESTUDOS EM PEIXES-ZEBRA.....	22
2.6. A TAURINA E SEUS EFEITOS BIOLÓGICOS.....	26
3. JUSTIFICATIVA.....	32
4. HIPÓTESES.....	34
5. OBJETIVOS.....	35
5.1 Objetivo geral.....	35
5.2. Objetivos específicos.....	35
6. DESENVOLVIMENTO.....	36
ARTIGO 1.....	37
ARTIGO 2.....	46
7. DISCUSSÃO.....	55
8. CONCLUSÕES.....	60
9. PERSPECTIVAS.....	61
ANEXO I – CARTA DE APROVAÇÃO DO CEUA – ARTIGOS 1 e 2.....	77
ANEXO II – PRORROGAÇÃO DA CARTA DE APROVAÇÃO DO CEUA.....	78
ANEXO III – PRODUÇÕES CIENTÍFICAS EM COLABORAÇÃO.....	79

1. APRESENTAÇÃO

A presente tese está organizada na seguinte maneira: a introdução, justificativa, hipóteses e objetivos do estudo estão apresentados na primeira parte deste documento. Em seguida, as metodologias e resultados estão descritos na forma de dois artigos científicos publicados, no item desenvolvimento. As seções discussão e conclusão, contém a análise integrada dos resultados obtidos e apresentam interpretações gerais sobre os artigos científicos, respectivamente. Posteriormente, as perspectivas destacam possibilidades de novos estudos a partir dos resultados obtidos. Por fim, as referências bibliográficas das citações realizadas no corpo do trabalho são apresentadas na parte final da tese.

2. INTRODUÇÃO

2.1. A ESQUIZOFRENIA

A esquizofrenia é uma doença neuropsiquiátrica crônica que atinge aproximadamente 0,3 – 0,7% da população mundial (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; SAHA et al., 2005). O que se entende por esquizofrenia atualmente é fruto de um conceito que sofreu transformações ao longo dos últimos 150 anos (ELKIS, 2000). Pode-se afirmar que o conceito de esquizofrenia teve origem a partir do termo *dementia praecox* ou demência precoce, descrito pelo psiquiatra alemão Emil Kraepelin, em seu livro “Tratado de psiquiatria”. Embora Kraepelin definiu a demência precoce com base em um curso característico (cronicidade) e resultado de um conjunto de sinais (emergência na adolescência ou início da vida adulta com permanência das funções mentais prejudicadas), ele não estabeleceu critérios específicos para seu diagnóstico (TANDON, NASRALLAH e KESHAVAN, 2009). Sob outra perspectiva, em 1911, o psiquiatra suíço Eugen Bleuler, definiu um conjunto fundamental de sintomas que ele considerava único para esquizofrenia. Ele acreditava que a essência da esquizofrenia não eram os delírios e alucinações (considerava sintomas assessorios), mas sim a desintegração de diferentes funções psíquicas que levavam a perda de associação, embotamento afetivo, ambivalência, entre outros sintomas (que hoje são conhecidos como sintomas negativos da doença). Bleuler cunhou o termo esquizofrenia que rapidamente substituiu o termo demência precoce (LAVRETSKY, 2008). Posteriormente, Kurt Schneider (1959), definiu 11 sintomas de primeira ordem característicos (hoje considerados sintomas positivos). Contudo, apesar da ênfase dada em psicose, percebeu-se que esses sintomas não eram específicos da esquizofrenia (TANDON, NASRALLAH e KESHAVAN, 2009). Atualmente, com base no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5º edição (DSM-5®), a esquizofrenia é diagnosticada como uma perturbação com duração mínima de seis meses, caracterizada pela presença de delírios, alucinações, discurso desorganizado, comportamento alterado ou catatônico, apatia e déficit cognitivo (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

A esquizofrenia é caracterizada por apresentar um conjunto heterogêneo de sintomas, incluindo os sintomas positivos, os sintomas negativos e déficit cognitivo. Os sintomas positivos são manifestados como comportamentos e pensamentos alterados e incluem as distorções da realidade como a psicose, as alucinações e os delírios. Os sintomas negativos correspondem a perda ou diminuição das funções normais e são representados pelo embotamento afetivo e da expressão emocional, a alogia (redução na quantidade de palavras

faladas e empobrecimento do discurso), a avolição (redução da atividade associada as metas devido a motivação diminuída), a anedonia (incapacidade de sentir prazer), e o embotamento social (CORRELL e SCHOOLER, 2020; KAHN et al., 2015). Problemas relacionados à memória, incluindo déficit de atenção, aprendizagem verbal e visual, dificuldades no raciocínio e resolução de problemas (déficit cognitivo) também são observados em pacientes com esquizofrenia (HEINRICHS e ZAKZANIS, 1998; TRIPATHI, KAR e SHUKLA, 2018). Em geral, os sintomas da esquizofrenia estão diretamente relacionados com uma menor qualidade de vida dos indivíduos que sofrem com a doença (TAN et al., 2019), visto que muitos pacientes com sintomas positivos experimentam a perda de contato com a realidade, fato que é prejudicial ao comportamento diário. Assim como os sintomas positivos, os sintomas negativos também afetam diretamente aspectos emocionais e relações sociais. Dessa forma, a perda de produtividade gerada pelo comprometimento cognitivo e social nessa doença, produz custos ainda maiores do que o seu tratamento, tornando a redução da incapacidade na esquizofrenia uma prioridade (HARVEY e STRASSNIG, 2019).

Embora dados de epidemiologia sugerem que a incidência da esquizofrenia é ligeiramente maior para o sexo masculino, alguns estudos mostram similaridade nesse quesito para ambos os sexos (CANNON et al., 1998; TANDON; KESHAVAN e NASRALLAH, 2008). No entanto, no sexo feminino a manifestação de sintomas é tardia (cerca de 25–35 anos), quando em comparação com o sexo masculino (18–25 anos) (CHAVES, 2000). Apesar da patofisiologia da esquizofrenia ainda não ser totalmente entendida, fatores genéticos e ambientais desempenham um importante papel no curso dessa doença (MUESER e MCGURK, 2004; VAN OS, KENIS e RUTTEN, 2010). Nesse aspecto, podemos destacar a migração e urbanicidade, complicações obstétricas e perinatais, idade paterna avançada no momento da concepção, e uso de *Cannabis sp.* durante a adolescência como fatores ambientais de risco (VAN OS, KENIS e RUTTEN, 2010). Apesar da influência dos fatores ambientais, sabe-se que a esquizofrenia tem um forte componente genético, e estudos com gêmeos estimam que sua herdabilidade é de aproximadamente 80% (CANNON et al., 1998; HILKER et al., 2018).

Existem alterações em diversas vias de neurotransmissores na esquizofrenia incluindo as vias serotoninérgica (AGHAJANIAN, 2000), GABAérgica (BENES, 2015), dopaminérgica (HOWES, MCCUTCHEON e STONE, 2015) e glutamatérgica (HU et al., 2015; KIM et al., 1980). A hipótese do envolvimento da dopamina na esquizofrenia surgiu na década de 70, onde observações as quais demonstraram que a administração de anfetaminas e outras substâncias que induzem o aumento na liberação de dopamina extracelular podem induzir sintomas

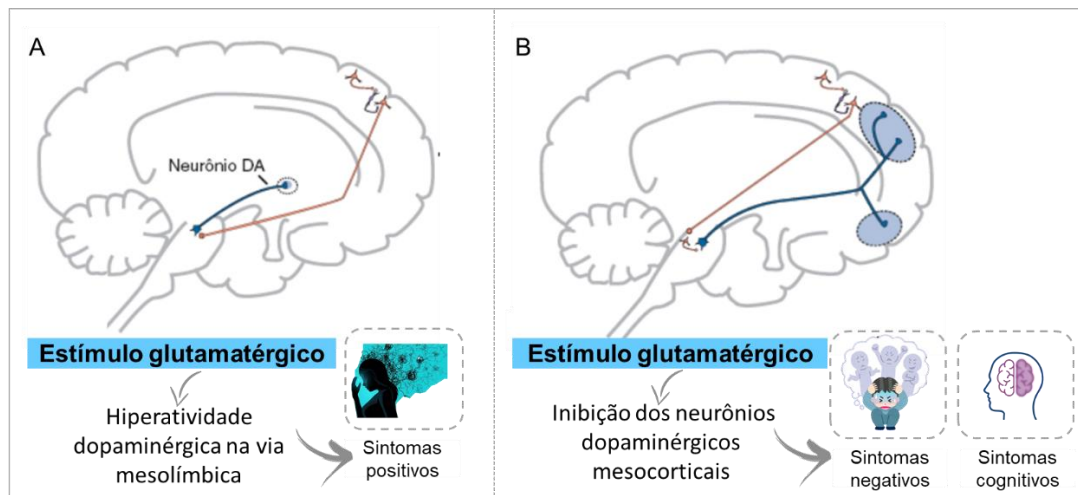
paralelos aos observados na psicose que ocorre nos pacientes (HOWES, MCCUTCHEON e STONE, 2015; LIEBERMAN, KANE e ALVIR, 1987). Esse fato, associado à efetividade clínica do tratamento com antipsicóticos que tem como alvo a via dopaminérgica e reduzem os sintomas de psicose, fornecem evidências as quais mostram que existem alterações na via dopaminérgica na esquizofrenia. Em geral, o tratamento da esquizofrenia pode ser realizado com antipsicóticos típicos incluindo haloperidol e clorpromazina (que atuam como antagonistas dos receptores dopaminérgicos D₂), resultando na diminuição dos sintomas positivos (LEO e REGNO, 2000). Apesar da eficácia para conter os sintomas positivos, o uso desses fármacos é limitado pela manifestação de efeitos colaterais (*e.g.* sintomas extrapiramidais e prolactinemia), e pela ineficácia para tratar os sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia (JANNO et al., 2004; LI, SNYDER e VANOVER, 2016). Assim, a busca por tratamentos farmacológicos alternativos torna-se imprescindível para melhorar a qualidade de vida dos pacientes afetados pela doença.

A hipótese do envolvimento da via serotoninérgica na esquizofrenia originou-se a partir de estudos os quais demonstraram as propriedades alucinógenas e interações da dietilamida do ácido lisérgico (LSD) e serotonina no sistema nervoso (AGHAJANIAN, 2000). Estudos pontuam que duas classes de drogas as indolaminas (*e.g.* LSD) e fenetilaminas (*e.g.* mescalina) atuam como pró-*psicóticos* gerando alucinações e tem como alvo os receptores serotoninérgicos 5HT-_{2A} (DE GREGORIO et al., 2016; LÓPEZ-GIMÉNEZ; GONZÁLEZ-MAESO, 2018), além de provocar uma melhora na neurotransmissão glutamatérgica. Juntos, esses estudos sinalizam o envolvimento de ambas as vias serotoninérgica e glutamatérgica na fisiopatologia da doença (AGHAJANIAN, 2000; COYLE, 1996a, 2006; REYNOLDS, 2005).

A associação do glutamato na esquizofrenia foi postulada inicialmente na década de 80 quando foi demonstrado que pacientes com esquizofrenia possuíam níveis menores de glutamato no líquido cefalorraquidiano (KIM et al., 1980). Posteriormente, observações evidenciaram que o abuso de drogas como cetamina e fenciclidina (PCP), antagonistas dos receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDA), produz sintomas muito semelhantes à psicose que ocorre na clínica da esquizofrenia (COYLE, 1996; JAVITT e ZUKIN, 1991). Além disso, alterações morfológicas em receptores de glutamato, envolvendo a diminuição no comprimento basal e no número de dendritos em neurônios piramidais no córtex pré-frontal (CPF) foram reportadas em pacientes esquizofrênicos (BROADBELT, BYNE e JONES, 2002; KALUS et al., 2000). É importante ressaltar que o glutamato pode regular a atividade de neurônios dopaminérgicos das vias dopaminérgicas mesocortical e mesolímbica, influenciando

hipoteticamente a manifestação de sintomas positivos, negativos e cognitivos da esquizofrenia (**Figura 1**). Em conjunto, esses dados evidenciam que alterações na via glutamatérgica estão presentes na esquizofrenia (HU et al., 2015). Portanto, a inibição dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos NMDA, obtida mediante a exposição a antagonistas dos receptores NMDA (*e.g.*, dizocilpina (MK-801), cetamina ou PCP), consiste em uma das principais estratégias farmacológicas para elucidar fenótipos comportamentais relacionados à esquizofrenia em modelos animais (BUBENÍKOVÁ-VALESOVÁ et al., 2008; LEE e ZHOU, 2019).

Figura 1. Hipofunção dos receptores NMDA e os sintomas positivos (**A**) e negativos (**B**) da esquizofrenia. Em relação aos sintomas positivos, sugere-se que os neurônios glutamatérgicos que se projetam do córtex para o tronco encefálico inervam os neurônios da via dopaminérgica mesolímbica, e, portanto, os estimulam. Nesse caso, o estímulo gerado provoca hiperatividade dos referidos neurônios, tal qual hipoteticamente ocorre nos sintomas positivos da esquizofrenia. Na realidade, a desregulação dos neurônios glutamatérgicos, ou seja, a inervação deficiente e hipofuncional é a causa hipotética da hiperatividade dos neurônios dopaminérgicos mesolímbicos. Nos sintomas negativos, os neurônios glutamatérgicos do córtex para o tronco encefálico, regulam neurônios dopaminérgicos específicos que se projetam apenas para a área tegmental ventral (VTA) no córtex pré-frontal (via mesocortical), em vez de regular a via mesolímbica. Desse modo, a ativação desses neurônios glutamatérgicos específicos leva inicialmente, a ativação de interneurônios gabaérgicos, os quais inibem neurônios dopaminérgicos mesocorticais, sendo esse estímulo responsável por desencadear os sintomas negativos. Por fim, a hipoatividade dos neurônios dopaminérgicos mesocorticais está associada a anormalidade na inervação glutamatérgica de interneurônios gabaérgicos contendo parvalbumina em suas sinapses de NMDA. Assim, sugere-se que diferentes populações de neurônios glutamatérgicos regulam diferentes populações de neurônios dopaminérgicos.

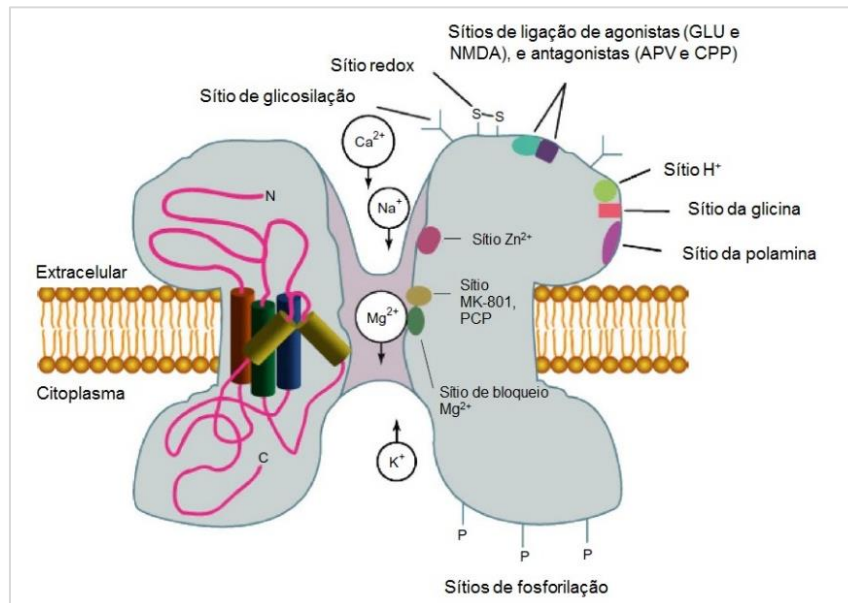


Fonte: adaptado de Stahl (2014).

2.2. O RECEPTOR N-METIL-D-ASPARTATO (NMDA)

Desde sua descoberta, há cerca de 40 anos, os receptores NMDA tem chamado a atenção dos cientistas devido ao papel essencial que estes desempenham no sistema nervoso central (SNC) (PAOLETTI, BELLONE e ZHOU, 2013). Os receptores NMDA são canais iônicos dependentes de voltagem, cuja ativação está envolvida em funções biológicas de extrema importância como plasticidade sináptica (HUNT e CASTILLO, 2012) e potenciação de longa duração (LTP) (CAMMAROTA et al., 2000; RIEDEL, PLATT e MICHEAU, 2003; RIEDEL e REYMANN, 1996). Além disso, a disfunção desses receptores é associada com o desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas como o vício à cocaína, abuso crônico de álcool, além da esquizofrenia (LAU e ZUKIN, 2007). Os receptores ionotrópicos glutamatérgicos são formados por proteínas integrais de membrana compostas por 4 subunidades grandes as quais formam o poro central do canal iônico (TRAYNELIS et al., 2010). Até o momento foram identificadas sete subunidades, ou seja, esse receptor é composto pela subunidade GluN1; quatro subunidades GluN2 (GluN2A, GluN2B, GluN2C e GluN2D); e um par de subunidades GluN3 (GluN3A e GluN3B) (PAOLETTI, BELLONE e ZHOU, 2013). Todas as subunidades compartilham uma arquitetura molecular envolvendo quatro domínios distintos: o domínio N-terminal (NTD); o domínio de ligação do agonista (ABD); o domínio transmembrana (TMD) contendo o canal iônico; e o domínio C-terminal intracelular (CTD) (PAOLETTI, BELLONE e ZHOU, 2013). O receptor NMDA exhibe propriedades que o distinguem de outros canais iônicos dependentes de voltagem (CULL-CANDY e LESZKIEWICZ, 2004). Primeiramente, o canal está sujeito a um bloqueio dependente de voltagem através da ligação com o íon Mg^{2+} , permanecendo inativo durante o repouso (NOWAK et al., 1984). Quando a célula pós-sináptica é despolarizada, o íon Mg^{2+} é liberado, provocando o desbloqueio do canal. Este processo, em conjunto com a ligação da glicina ou D-serina e do glutamato em seus respectivos sítios de ligação no receptor NMDA, favorece a abertura do canal e entrada de íons de Ca^{2+} e Na^{+} na célula (UNO e COYLE, 2019). O influxo de Ca^{2+} induz uma cascata de eventos intracelulares que medeiam a plasticidade sináptica e promovem mudanças na expressão gênica que levam à plasticidade estrutural neuronal (BALU, 2016). Além disso, a atividade do receptor NMDA pode ser fortemente influenciada pela presença dos íons H^{+} e Zn^{2+} (CULL-CANDY e LESZKIEWICZ, 2004), bem como pela glicina e a D-serina, co-agonistas necessários para ativação, e poliaminas (*e.g.*, espermina e espermidina) que atuam por melhorar a função desse receptor (SWETT, 2010) (**Figura 2**).

Figura 2. Ilustração do receptor NMDA, contendo sítios de ligação de antagonistas, agonistas e outras moléculas com ação modulatória.



Fonte: Adaptado de Sweatt (2010).

2.3. O PEIXE-ZEBRA COMO ORGANISMO MODELO

O peixe-zebra (*Danio rerio*) também conhecido como zebrafish ou paulistinha, é um pequeno teleosteo da família Cyprinidae, o qual é endêmico do sudeste Asiático (ARUNACHALAM et al., 2013; ENGESZER et al., 2007). Seu emprego na pesquisa científica cresceu exponencialmente nas últimas décadas (KALUEFF, STEWART e GERLAI, 2014), destacando-se como ferramenta alternativa na modelagem de doenças relacionadas ao neurodesenvolvimento (DE ABREU et al., 2019; MESHALKINA et al., 2018) e doenças neuropsiquiátricas como a esquizofrenia (DEMIN et al., 2019; GAWEL et al., 2019). Além do repertório comportamental bem caracterizado (KALUEFF et al., 2013), essa espécie possui aspectos neuroquímicos conservados quando comparada com mamíferos, ou seja, o peixe-zebra possui os principais neurotransmissores e seus receptores, transportadores, e enzimas de síntese e metabolismo descritos para roedores e humanos (PANULA et al., 2006). A expressão de genes da família do receptor NMDA foi identificada em embriões de peixe-zebra, sendo 2 genes correspondentes à subunidade (GluN1) e oito genes relacionados à subunidade (GluN2) (COX, KUCENAS e VOIGT, 2005), reforçando a conservação evolutiva destes receptores na espécie. Por fim, à fácil reprodutibilidade, baixo custo e fácil manutenção (FONTANA et al., 2018;

KALUEFF, STEWART e GERLAI, 2014; KOKEL e PETERSON, 2008; STEWART et al., 2015), associados ao fato que 82% dos genes relacionados a doenças humanas compartilham pelo menos um ortólogo em peixes-zebra (HOWE et al., 2013), reforçam a validade da espécie para modelagem de doenças do SNC e *screening* de compostos neuroprotetores, na perspectiva translacional.

Outro ponto que merece destaque é que o eixo hipotálamo-pituitária-interrenal (HPI) do peixe-zebra possui similaridade anatômica e fisiológica ao eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) nos seres humanos (ALSOP e VIJAYAN 2009, 2008; WENDELAAR BONGA, 1997). Desse modo, o peixe-zebra e seres humanos secretam o cortisol, enquanto que os roedores possuem a corticosterona como principal hormônio sintetizado frente às situações estressoras (JOËLS, KARST e SARABDJITSINGH, 2018; SADOUL e GEFFROY, 2019). Além disso, a espécie possui robustez em respostas comportamentais e fisiológicas que ocorrem após a eventos estressores agudos ou crônicos (DEMIN et al., 2020), fato que evidencia a grande valia do peixe-zebra, possibilitando seu emprego em pesquisas que visem estimar a relação entre estresse e doenças mentais como a esquizofrenia.

Em modelos animais, manipulações farmacológicas produzem alterações comportamentais específicas que remetem para alguns dos sintomas clínicos da esquizofrenia (BUBENÍKOVÁ-VALESOVÁ et al., 2008; NEILL et al., 2010). Reconhecemos que o peixe-zebra, como outros modelos animais incluindo roedores, não desenvolve a esquizofrenia tal qual ocorre em seres humanos. No entanto, o peixe-zebra é útil para estudar certos fenótipos observáveis em diversos transtornos neuropsiquiátricos (GAWEL et al., 2019; KALUEFF, STEWART e GERLAI, 2014; SEIBT et al., 2010; 2011). Nesse sentido, a hiperlocomoção gerada por pró-psicóticos reflete os sintomas positivos da esquizofrenia em seres humanos, enquanto que os déficits na interação social são equivalentes aos sintomas negativos dessa doença (GAWEL et al., 2019). Além disso, o déficit cognitivo observado nos modelos animais de esquizofrenia, geralmente, reflete o déficit de memória que acomete a maioria dos pacientes afetados. Apesar da grande e crescente utilidade do peixe-zebra para modelar tanto fenótipos como mecanismos neurobiológicos que refletem a esquizofrenia, em geral, esse modelo também possui algumas limitações inerentes à biologia da espécie.

Embora muitos modelos de roedores podem ser adaptados ou reproduzidos em peixe-zebra com validade de face e de constructo, tanto para fenótipos comportamentais como para manipulações genéticas e farmacológicas relevantes para esquizofrenia, na atualidade esse modelo continua subutilizado (DEMIN et al., 2019). Contudo, mimetizar certos sintomas de

esquizofrenia como estados delirantes, fala anormal, ausência de motivação e expressão emocional reduzida é complicado ou mesmo impossível em peixe-zebra (e roedores) (DEMIN et al., 2019). No entanto, os sintomas positivos dessa doença relacionados à psicose, geralmente envolvem a hiperatividade clínica, e uma correlação é sugerida com a hiperlocomoção que ocorre nos animais após a administração de psicóticos. Nesse aspecto, cuidado é necessário na interpretação dos dados, pois, a neurobiologia da atividade locomotora e da psicose são diferentes. Assim, somente a mudança na locomoção dos peixes ou roedores pode não auxiliar o avanço sobre o entendimento da patologia da esquizofrenia, sendo difícil saber a robustez e consistência desse parâmetro (DEMIN et al., 2019). Estudos sugerem que a investigação de mudanças na locomoção deve ser complementada com uma análise profunda de múltiplos fenótipos associados à esquizofrenia (HAYES et al., 2016; JONES, WATSON e FONE, 2011). Apesar da relevância da hiperlocomoção para o estudo da esquizofrenia ser debatida, experimentalmente esse fenótipo pode ser induzido por psicoestimulantes, sendo relativamente bem estudado em peixe-zebra (BRAIDA et al., 2007; CACHAT et al., 2013; KYZAR et al., 2013; MENEZES et al., 2015; NEELKANTAN et al., 2013; SEIBT et al., 2010).

Embora os efeitos dos antipsicóticos em peixes-zebra estão alinhados com efeitos observados em estudos com roedores (GOBIRA et al., 2013; SEIBT et al., 2010, 2012), cuidado deve ser tomado para interpretar os dados, desde que estes podem não necessariamente auxiliar no desenvolvimento de novos tratamentos farmacológicos. Por conseguinte, a sensibilidade do peixe-zebra a novos antipsicóticos é desconhecida e merece investigações futuras. Embora protocolos de anedonia sejam estabelecidos em roedores, até o momento não existe um protocolo bem estabelecido para a análise deste fenômeno em peixe-zebra (DEMIN et al., 2019). Sabe-se que a anedonia e avolição (falta de motivação) contribuem muito para impactar o desempenho diário de indivíduos com esquizofrenia, provocando incapacidade (RABINOWITZ et al., 2012). Dessa forma, estudos futuros para padronizar o desenvolvimento e avaliação desses fenótipos em peixe-zebra são imprescindíveis.

Outro ponto importante é que o comportamento social pode ser avaliado facilmente em peixes-zebra (PHAM et al., 2012), porém, transladar o déficit social que ocorre após a administração de pró-psicóticos nesse modelo para aquele observado na clínica dos transtornos neuropsiquiátricos como a esquizofrenia pode ser complicado (DEMIN et al., 2019). Nesse aspecto, a ausência do córtex cerebral em peixe-zebra torna-se uma limitação (KALUEFF, ECHEVARRIA e STEWART, 2014), desde que essa estrutura é fortemente associada a cognição social em mamíferos (ADOLPHS, 2003). Contudo, outras estruturas e circuitos

neurais também são envolvidos no comportamento social (*e.g.*, habenula, núcleo dorsal da rafe, hipotálamo, amígdala, septo lateral, cerebelo, área preóptica e mesencéfalo), as quais o peixe-zebra possui correspondentes homólogos (GENG e PETERSON, 2019; HASHIMOTO e HIBI, 2012; KOZOL et al., 2016). Recentemente, foi postulado que os traços sociais apresentam base evolutiva conservada em peixes-zebra, roedores e seres humanos (FONTANA et al., 2021). Indubitavelmente, o peixe-zebra pode servir como modelo farmacológico para estudos de esquizofrenia (GAWEL et al., 2019) e, nesse aspecto, ênfase deve ser dada a modelos que busquem investigar os mecanismos neurobiológicos e neurofisiológicos e sua relação com os fenótipos existentes na clínica.

2.4. O MK-801 COMO MODELO FARMACOLÓGICO DE ESQUIZOFRENIA

O MK-801 é um antagonista não competitivo dos receptores NMDA, que atua bloqueando a abertura do canal iônico (NOWAK et al., 1984; SONG et al., 2018). Essa molécula foi originalmente desenvolvida como uma substância neuroprotetora e anticonvulsivante no ano de 1982 (KOCHHAR, ZIVIN e MAZZARELLA, 1991). Além disso, MK-801 possui diversos efeitos fisiológicos no SNC envolvendo analgesia e anestesia (KOVACIC e SOMANATHAN, 2010). Apesar de mostrar atividade neuroprotetora em modelos de isquemia, essa substância pode induzir degeneração neuronal e comportamento psicótico (KOVACIC e SOMANATHAN, 2010). Todavia, os efeitos colaterais podem ocorrer devido à alta afinidade e longo tempo de ocupação que a droga exerce nos receptores alvo, o que impede seu uso na clínica (SONG et al., 2018). Estudos evidenciaram que a administração aguda de antagonistas dos receptores NMDA (cetamina e PCP) provoca efeitos diversos no SNC, incluindo o aumento dos níveis extracelulares de glutamato e de catecolaminas, como dopamina (MOGHADDAM et al., 1997) e serotonina (MARTIN, CARLSSON e HJORTH, 1998). Acredita-se que o bloqueio com antagonistas não-competitivos, como o MK-801, gera uma hipofunção nos receptores NMDA, a qual resulta em estímulo excessivo de outras classes de receptores glutamatérgicos, tais como os alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e cainato (KA) (DEUTSCH et al., 2001). Uma vez que os neurônios GABAérgicos são ativados pelo estímulo dos receptores NMDA localizados em sua superfície, usualmente, após a liberação de ácido gama-aminobutírico (GABA), ocorre a ativação dos canais de íons cloreto que estão localizados na superfície de neurônios glutamatérgicos inibindo-os (DEUTSCH et al., 2001). Desse modo, o antagonismo dos receptores NMDA é complexo e pode causar a desinibição das projeções glutamatérgicas, resultando em um aumento na

liberação de glutamato e uma cascata de eventos excitotóxicos, culminando na geração de espécies reativas de oxigênio e apoptose (DEUTSCH et al., 2001). Dessa forma, a exposição a antagonistas dos receptores NMDA (cetamina) pode provocar alterações significativas em interneurônios inibitórios corticais, levando a perda da expressão da proteína de ligação ao cálcio parvalbumina e da enzima glutamato descarboxilase (GAD67) (BEHRENS et al., 2007), a qual fornece um passo limitante para síntese de GABA. Além disso, roedores expostos ao MK-801 apresentam uma síndrome comportamental envolvendo ataxia e hiperlocomoção (LÖSCHER e HÖNACK, 1992; MARTIN et al., 1997), disfunção do comportamento social (RUNG et al., 2005) e déficit cognitivo (CASTELLANO et al., 1999). Tais alterações comportamentais são atribuídas ao efeito modulatório do MK-801 nos sistemas glutamatérgico (CHARTOFF, HEUSNER e PALMITER, 2005), serotoninérgico e noradrenérgico (LÖSCHER e HÖNACK, 1992).

2.5. O MK-801 E SEUS EFEITOS BIOLÓGICOS: ESTUDOS EM PEIXES-ZEBRA

Em peixes-zebra, uma ampla gama de estudos evidencia que a exposição ao MK-801 desencadeia alterações em vários domínios comportamentais, dentre esses destacam-se a locomoção e a sociabilidade. Em geral, alguns estudos mostram que a exposição ao MK-801 não altera a locomoção, ou então, diminui a atividade locomotora (BENVENUTTI et al., 2021; SWAIN, SIGSTAD e SCALZO, 2004), enquanto que outros mostram que o MK-801 gera hiperatividade (*e.g.*, aumento na distância percorrida, no número de cruzamentos, e na velocidade média) (MENEZES et al., 2015; SEIBT et al., 2010). Notavelmente, no quesito locomoção, alguns dados são controversos e mais estudos são necessários para esclarecer tais discrepâncias. Contudo, diferenças nas concentrações (2, 5, 10, 20, ou 100 μM), tempos de exposição (30 ou 60 min), e duração do teste (30 ou 60 min), podem refletir algumas disparidades observadas (BENVENUTTI et al., 2021; SISON e GERLAI, 2011; SWAIN, SIGSTAD e SCALZO, 2004). Paralelamente, a exposição ao MK-801 resulta no aumento significativo de comportamentos estereotipados do tipo psicose, incluindo o nado circular na superfície da água (ECHEVARRIA et al., 2008; SISON e GERLAI, 2011; SWAIN, SIGSTAD e SCALZO, 2004). Apesar de Swain et al. (2004) ter observado um aumento do nado circular nas concentrações de 2 a 20 μM , em outro estudo o aumento significativo de rotações foi observado somente quando os animais foram expostos a MK-801 100 μM , por 30 min antes ou durante a realização do teste (SISON e GERLAI, 2011). Em relação a isso, foi discutido que o

peixe-zebra pode responder adversamente à falta de sais na água, e este fato pode ter contribuído para os efeitos adversos observados por Swain et al. 2004, desde que os autores expuseram os animais em meio de água deionizada, em vez de expor a água do sistema reconstituída com sais (SISON e GERLAI, 2011). Outro dado interessante, é que o peixe-zebra exposto ao MK-801 10 ou 20 μM permanece mais tempo na área do topo do aquário, o que pode ser indicativo de ansiedade reduzida (BENVENUTTI et al., 2021; ECHEVARRIA et al., 2008; SEIBT et al., 2010). Em geral, esses dados são paralelos com aqueles observados em roedores, pois, o MK-801 reduz a ansiedade relacionada a defesa antipredatória em roedores (BLANCHARD et al., 1992).

De modo geral, a inativação dos receptores NMDA pode gerar déficit cognitivo em animais, sinalizando o envolvimento da via glutamatérgica na aprendizagem e memória (BLANK et al., 2009; RIEDEL, PLATT e MICHEAU, 2003). Em peixe-zebra, uma única exposição ao MK-801 20 μM por 15 min, realizada após a sessão treino é suficiente para prejudicar a consolidação da memória no teste da esQUIVA inibitória (BLANK et al., 2009). Similarmente, a exposição repetida por 4 dias de MK-801 20 μM 1 hr por dia, (exposição realizada antes do treino) também prejudica a aquisição de memória de evitação na esQUIVA de choque (NG et al., 2012). O déficit de memória foi acompanhado pela inibição da aprendizagem associada à ativação da quinase regulada por sinal extracelular (ERK) no telencéfalo de peixe-zebra (NG et al., 2012). Uma vez que as proteínas quinases estão envolvidas na formação da potenciação de longa duração (LTP) no telencéfalo do peixe-zebra (NAM, KIM e LEE, 2004), o MK-801 parece induzir déficit cognitivo através da inibição da sinalização das ERK (NG et al., 2012). Em outro estudo, a exposição repetida ao MK-801 (20 μM por 4 dias) resulta em uma diminuição da preferência pelo ambiente enriquecido em peixe-zebra (SWAIN, SIGSTAD e SCALZO, 2004).

Em modelos animais de inibição dos receptores NMDA, o déficit social emerge como um importante fenótipo. Em peixe-zebra, a exposição ao MK-801 a 5, 10, e 100 μM diminui a preferência social (BENVENUTTI et al., 2021; SEIBT et al., 2011; SISON e GERLAI, 2011; ZIMMERMANN et al., 2016). Contudo, a exposição aos antipsicóticos sulpirida e olanzapina reverte a diminuição da preferência pelo estímulo social induzida pelo MK-801 (SEIBT et al., 2011). Do mesmo modo, a administração de ocitocina e carbetocina (agonista do receptor de ocitocina) recupera o déficit social e a diminuição do comportamento do tipo agressivo induzidos pelo MK-801, sugerindo que o neuropeptídeo ocitocina está envolvido na modulação de diferentes aspectos do comportamento social em peixes-zebra (ZIMMERMANN et al.,

2016). Outras alterações induzidas por MK-801 envolvem a redução do comportamento de cardume em peixe-zebra (ECHEVARRIA et al., 2008). De fato, animais expostos ao MK-801 a 20 μ M tornaram-se significativamente mais dispersos, 5 min após o contato com a droga (tempo necessário para absorção da droga pelas brânquias) (ECHEVARRIA et al., 2008). Em geral, cardumes de quatro peixes-zebra tratados com MK-801 apresentam um aumento na distância entre os peixes, na distância do vizinho mais distante, e distância do vizinho mais próximo, além de uma redução significativa na interação social. Nesse aspecto, uma diminuição da coesão social pode ser intensificada com o aumento da concentração de MK-801 (1, 2 e 5 μ M) (MAASWINKEL, ZHU e WENG, 2013). Outro dado interessante, é que comportamentos não sociais do cardume também foram alterados pelo MK-801, onde um aumento na distância do fundo e da distância percorrida, e redução na distância do centro foram observados após a exposição a concentração mais alta utilizada de MK-801 (5 μ M). Além disso, em cardumes heterogêneos, um único peixe tratado com MK-801 possui uma reduzida coesão social quando comparado ao cardume como um todo (MAASWINKEL, ZHU e WENG, 2013). Nesse aspecto, os animais não tratados do cardume heterogêneo, passaram a seguir o animal tratado com MK-801, e com isso, o cardume inteiro tornou-se mais espalhado (MAASWINKEL, ZHU e WENG, 2013). Em geral, os comportamentos não-sociais mencionados previamente pareceram ser menos alterados do que a coesão social pela presença de um único peixe-zebra tratado com MK-801 no cardume (MAASWINKEL, ZHU e WENG, 2013). Contudo, mais pesquisas são necessárias para investigar as alterações na dinâmica social e não social de cardumes heterogêneos.

Em modelos experimentais, a exposição ao MK-801 pode gerar um desbalanço no sistema redox no SNC, culminando em estresse oxidativo (OZYURT et al., 2007). Existe uma similaridade no metabolismo do MK-801 com o da cocaína, em relação ao envolvimento de uma amina secundária, com formação subsequente de hidroxilamina, o que lhe confere participação do metabolismo redox, com potencial capacidade para transferência de elétrons e formação de radicais livres (KOVACIC e SOMANATHAN, 2010). Em roedores, a exposição repetida ao MK-801 tem mostrado induzir estresse oxidativo por aumentar os níveis de malondialdeído (MDA), proteínas carboniladas (PC), óxido nítrico (ON), bem como aumentar a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) (OZYURT et al., 2007). De maneira similar, o MK-801 pode ser neurotóxico por aumentar a degeneração e morte de células neuronais localizadas no córtex cingulado posterior/retroespinal de roedores (KURODA et al., 2015; WOZNIAK et al., 1996). Contudo, estudos de meta análise tem

ênfatisado que pacientes com esquizofrenia possuem alterações no metabolismo redox (*e.g.*, níveis aumentados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS e atividade elevada da enzima SOD), indicando que essas alterações estão presentes na doença (GAMA et al., 2008; ZHANG et al., 2010). Esses estudos sugerem que a exposição ao MK-801 produz alterações neuroquímicas relacionadas à patofisiologia da esquizofrenia e, portanto, constitui uma interessante estratégia para *screening* de compostos neuroprotetores.

Previamente, foi demonstrado que MK-801 (20 μ M) durante 15 min aumenta significativamente a peroxidação lipídica e diminui a atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase em encéfalo de peixe-zebra, efeito revertido pela exposição aos antipsicóticos haloperidol, sulpirida e olanzapina (SEIBT et al., 2012). Contudo, o mesmo estudo mostra que a produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio não é alterada pela exposição ao MK-801 (SEIBT et al., 2012). Outro dado interessante é que a exposição ao MK-801 (1, 5 e 10 μ M) por 10 min, embora não altera significativamente a peroxidação lipídica, resulta em ligeiro aumento dos níveis de TBARS, não observado após 60 min de exposição (BENVENUTTI et al., 2021). Além disso, os níveis de tióis não proteicos (NPSH) não são alterados pela exposição ao MK-801 (BENVENUTTI et al., 2021). Notavelmente, as discrepâncias observadas nos dados bioquímicos, podem ser atribuídas as diferentes concentrações e tempos de exposição empregados, sendo necessário realizar mais estudos para esclarecer o papel exato do MK-801 no metabolismo oxidativo de peixe-zebra. Por fim, geralmente, estudos demonstram o envolvimento do estresse oxidativo (GAMA et al., 2008; ZHANG et al., 2010), inflamação (HOWES e MCCUTCHEON, 2017), diminuição na atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase (ROY et al., 2016) resposta de estresse alterada (GISPEN-DE WIED, 2000), e alterações comportamentais (KAHN et al., 2015; TANDON, NASRALLAH e KESHAVAN, 2009) nos processos neuropatológicos que compreendem a esquizofrenia, evidenciando assim, que esses parâmetros podem ser considerados alvos para estudos futuros.

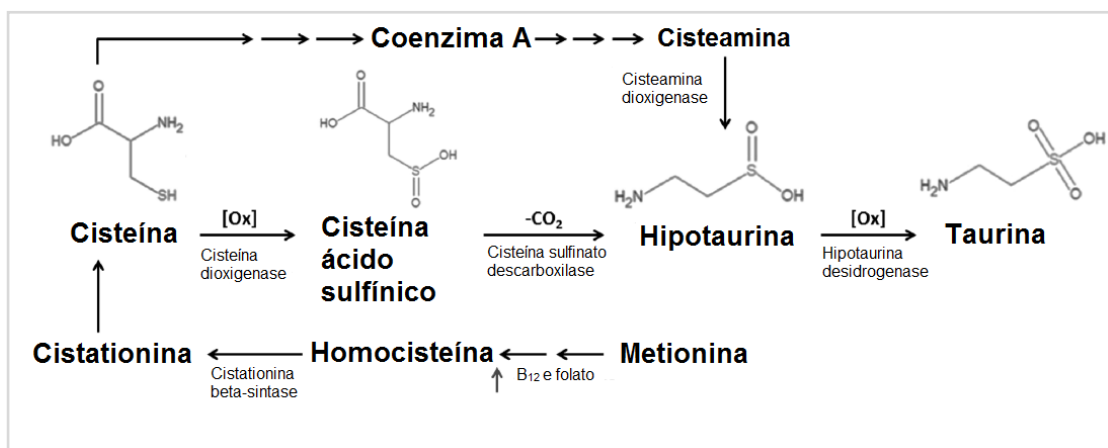
Acredita-se que na maioria das doenças neuropsiquiátricas o estresse é um fator não genômico que pode contribuir para exacerbar os sintomas, induzir recaídas após o período de remissão e prejudicar o tratamento (MOGHADDAM, 2002). Evidências sugerem que o eixo HPA é alterado em muitas doenças mentais (BRADLEY e DINAN, 2010; YEHUDA, 2002). De fato, pacientes com esquizofrenia podem apresentar modificações significativas na atividade do eixo HPA, com hipo ou hiper liberação de cortisol a depender de diversos fatores (BRADLEY e DINAN, 2010), indicando que estudos são necessários para esclarecer as bases neuroendócrinas subjacentes à esquizofrenia. Atualmente, não se sabe como a administração

de MK-801 afeta o eixo HPI do peixe-zebra e estudos futuros podem ser realizados buscando investigar os efeitos do MK-801 no eixo HPI e em fenótipos comportamentais em peixe-zebra. Além disso, considerando os efeitos colaterais oriundos do tratamento da esquizofrenia, a busca por moléculas com propriedades neuroprotetoras, as quais possam melhorar significativamente a qualidade de vida das pessoas que sofrem de esquizofrenia é de suma importância.

2.6. A TAURINA E SEUS EFEITOS BIOLÓGICOS

A taurina (ácido 2-aminoetanossulfônico) é um β -aminoácido, o qual foi descoberto no ano de 1827 presente na bile de bovinos. Essa molécula desempenha um importante papel fisiológico, sendo crucial para o desenvolvimento do cérebro, retina e sistema imunológico, assim como para a regulação da atividade do músculo cardíaco e inflamação (HUXTABLE, 1992). Em mamíferos, a taurina está disponível em diversos tecidos incluindo músculo esquelético, músculo cardíaco, retina e encéfalo (HUXTABLE, 1992). Entre indivíduos, a síntese de taurina pode ser variável, dependendo de fatores como estado nutricional, absorção de proteínas e disponibilidade da cisteína (HUXTABLE, 1992). A taurina pode ser sintetizada principalmente pelo fígado e rins, através da via da cisteína ácido sulfínico (DE LUCA, PIERNO e CAMERINO, 2015) (**Figura 3**). As reações de síntese consistem primeiramente na oxidação da cisteína em cisteína ácido sulfínico, pela enzima cisteína dioxigenase, com subsequente ação da enzima cisteína ácido sulfínico descarboxilase (CAS descarboxilase) e formação de hipotaurina. Por fim, a taurina é produzida por oxidação enzimática da hipotaurina (DE LUCA, PIERNO e CAMERINO, 2015).

Figura 3 – Rota de biossíntese da taurina a partir dos aminoácidos metionina e cisteína.



Fonte: Adaptado de De Luca; Pierno e Camerino (2015).

Em seres humanos, a concentração intracelular de taurina pode variar de 5–20 $\mu\text{mol/g}$ no encéfalo, retina, músculo esquelético e cardíaco (DE LUCA, PIERNO e CAMERINO, 2015; HUXTABLE, 1992). Já no meio extracelular, as concentrações de taurina são menores e variam de 10 a 100 μM (DE LUCA, PIERNO e CAMERINO, 2015). Em geral, a presença de um transportador específico de taurina, transportador TauT, codificado pelo gene SLC6A6, garante uma maior concentração dessa molécula no meio intracelular. Em peixe-zebra, a proteína TauT apresenta 625 aminoácidos, e possui homologia de 73–81 % com ortólogos humanos (KOZLOWSKI et al., 2008). Além disso, foi demonstrado que a expressão de RNA mensageiro de TauT está presente durante a embriogênese de peixe-zebra desde os estágios iniciais (1–4 células), sendo detectada principalmente nos somitos, notocorda, retina, SNC, cauda e coração (KOZLOWSKI et al., 2008). Da mesma forma, a CAS descarboxilase, enzima a qual fornece o passo limitante para a biossíntese de taurina, é expressa em vários tecidos (notocorda, fígado, pâncreas, rins, cauda e cérebro) desse vertebrado (CHANG et al., 2013). Contudo, a taurina não foi apenas identificada, mas corresponde ao quarto aminoácido mais abundante depois do ácido glutâmico, alanina, e ácido aspártico em peixe-zebra (KOZLOWSKI et al., 2008). Previamente, demonstrou-se que animais knockout para TauT apresentam atraso no desenvolvimento embrionário e apoptose em células do sistema nervoso (KOZLOWSKI et al., 2008), e que redução da expressão da CAS descarboxilase resulta na diminuição dos níveis de taurina, aumento de mortalidade, e anomalias cardíacas (CHANG et al., 2013). Tais achados sinalizam que o papel fisiológico da taurina é evolutivamente conservado em vertebrados, e que diferentes espécies podem ser úteis para estudar mecanismos neuroquímicos e fisiológicos da taurina em diferentes contextos (MEZZOMO et al., 2018).

Por ser um aminoácido naturalmente sintetizado no corpo do ser humano (e de outros seres vivos) é provável que a suplementação com taurina não apresente efeitos colaterais (JAKARIA et al., 2019). Nesse aspecto, estudos de toxicidade demonstram que essa molécula não exerce efeito teratogênico, carcinogênico ou genotóxico (MENZIE, PRENTICE e WU 2013; STURMAN e MESSING, 1992). Contudo, poucos estudos reportam os limites toleráveis de ingestão de taurina. Desse modo, demonstrou-se que a ingestão de taurina 0,4 % administrada na água de beber de cobaias (porcos da índia) por duas semanas aumentou o acúmulo de gordura no fígado (CANTAFORA et al., 1986). Apesar disso, a Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (EFSA) considera que a ingestão de 1000 mg/kg de taurina em drinks energéticos não produz efeitos adversos (EFSA, 2009). Por fim, a taurina 3 g por dia também não apresentou efeitos colaterais de acordo com estudos toxicológicos mostrados em

uma revisão feita com triagens clínicas em humanos (SHAO e HATHCOCK, 2008). Juntos, esses dados indicam que em quantidades moderadas a ingestão de taurina não produz efeitos adversos, porém é necessário tomar cuidado com a ingestão excessiva principalmente a longo prazo.

A taurina desempenha funções biológicas relevantes a nível de SNC (MEZZOMO et al., 2018), onde podemos destacar seu papel antioxidante (FONTANA et al., 2019; ROSEMBERG, et al., 2010; THIRUPATHI et al., 2018), neuromodulador (CHEN et al., 2001; WU et al., 2005) e estabilizador de membranas (HUXTABLE e BRESSLER, 1973). Devido ao seu potencial terapêutico para tratar doenças neurológicas e neuropsiquiátricas, essa molécula tem sido alvo de estudos recentes (JAKARIA et al., 2019; MEZZOMO et al., 2018). A taurina previne a morte celular induzida pela hiperestimulação do sistema glutamatérgico (WU e PRENTICE, 2010). O mecanismo de ação dessa molécula envolve a ativação de receptores ionotrópicos (iTauR) e metabotrópicos (mTauR) de taurina, o que leva à diminuição da concentração intracelular de Ca^{2+} . Isso inibe a ativação da *BCL-2 associated protein X* (BAX), proteína pró-apoptótica que têm como alvo os mediadores da cascata de morte neuronal na mitocôndria (JAKARIA et al., 2019). A proteína *B-cell lymphoma protein 2* (BCL-2), é expressa em células de linfoma não Hodgkin humano e tem a função de inibir a apoptose (FARIA et al., 2006). Pelo fato da taurina suprimir a atividade de BAX, ela inibe a ativação de caspases e a cascata de morte neuronal mediada pela mitocôndria é impedida (JAKARIA et al., 2019). Como neuromoduladora, a taurina é agonista dos receptores GABA_A e glicina, e diminui o influxo de Ca^{2+} , prevenindo a excitotoxicidade de glutamato (CHEN et al., 2001; CURRAN e MARCZINSKI, 2017; OJA e SARANSAARI, 2013; SAMUELSSON et al., 2013; YE, SHI e YIN, 2013). Apesar de ter como alvo diferentes vias de neurotransmissores, sabe-se que a taurina não atua diretamente na via dopaminérgica, o que a torna diferente dos antipsicóticos convencionais empregados para tratar a esquizofrenia. Por desempenhar ação benéfica no SNC, a taurina é uma molécula candidata em estudos de *screening* de drogas visando neuroproteção em doenças neurológicas e neuropsiquiátricas.

Estudos com peixes-zebra demonstraram diversos efeitos benéficos da taurina tanto em domínios comportamentais quanto em bioquímicos (FONTANA et al., 2019; MEZZOMO et al., 2016, 2018, 2019; ROSEMBERG et al., 2010, 2012). A taurina tem mostrado antagonizar os efeitos da exposição aguda ao etanol em muitos aspectos. Por exemplo, o pré-tratamento com taurina diminui a peroxidação lipídica e previne o aumento da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) induzidos pela exposição aguda ao etanol (ROSEMBERG et al.,

2010). Além disso, foi demonstrado que o etanol 1% prejudica a consolidação da memória no teste da esQUIVA inibitória, e que o pré-tratamento com taurina previne o déficit cognitivo induzido por etanol em peixes-zebra (BERTONCELLO et al., 2019). Paralelamente, a exposição repetida a taurina 42 e 150 mg/L (60 min por dia, durante 4 dias) previne o déficit cognitivo induzido pela exposição repetida ao etanol 1% (20 min por dia, durante 8 dias) (STEFANELLO et al., 2021). Complementando dados prévios, esse mesmo tratamento com taurina mostrou atenuar o déficit social e comportamento do tipo ansiedade resultante da exposição intermitente ao etanol (STEFANELLO et al., 2021). Ademais, o pré-tratamento com taurina previne alterações no comportamento do tipo ansiedade induzidas pela exposição aguda ao etanol 1% por 20 min, e alterações locomotoras (hipolocomoção) que ocorrem após 60 min de exposição (ROSEMBERG et al., 2012). Em geral, esses efeitos benéficos podem ser atribuídos a uma redução na quantidade de etanol que chega no encéfalo dos animais pré-tratados com taurina e também ao papel neuromodulador que essa molécula exerce no SNC (MEZZOMO et al., 2018; ROSEMBERG et al., 2012).

Os efeitos da taurina e do cotratamento de taurina com etanol 0,25% na agressividade de peixes-zebra foram investigados (FONTANA et al., 2016). Em geral, as concentrações de taurina 42 e 400mg/L e os cotratamentos taurina 42mg/L/etanol e taurina 400mg/L/etanol aumentaram a agressão, enquanto que a taurina 150 mg/L não altera esse parâmetro, e o cotratamento com taurina 150mg/L previne o aumento de agressão induzido pelo etanol, antagonizando os efeitos da exposição aguda a essa droga (FONTANA et al., 2016). Nesse aspecto, hipotetizou-se que as diferentes respostas observadas, são altamente dependentes da concentração utilizada, indicando um efeito bifásico da taurina em comportamentos relacionados a agressão (FONTANA et al., 2016). Recentemente, o envolvimento da via serotoninérgica no comportamento do tipo agressão induzido pela taurina na concentração 42mg/L foi evidenciado (MEZZOMO et al., 2020). Quando tratados com ρ -chlorophenylalanine (ρ CPA), um inibidor da síntese de serotonina, e WAY100135 um antagonista dos receptores 5-HT_{1A}, o comportamento do tipo agressão induzido pela taurina é abolido, sugerindo que a agressão induzida pela taurina é regulada pela liberação de serotonina, e subsequente ativação dos receptores 5-HT_{1A} em peixes-zebra (MEZZOMO et al., 2020). Os efeitos do cotratamento com taurina e etanol 0,25% no comportamento social e respostas de medo também foram investigados (FONTANA et al., 2018a). No teste de ‘cardume’ o cotratamento com a taurina 400 mg/L previne os déficits temporais na coesão de cardume induzidos por etanol, porém prejudica a busca por coespecíficos no teste de preferência social

(FONTANA et al., 2018a). Apesar da taurina não modular os efeitos do etanol em alguns parâmetros comportamentais, essa substância parece recuperar os efeitos do etanol quando o número de interações é avaliado no teste do cardume. Outro ponto fundamental, é que diferentes testes comportamentais podem elicitar respostas comportamentais distintas em um mesmo domínio comportamental dependendo do contexto (FONTANA et al., 2018a). Com relação ao comportamento de medo, a exposição ao etanol e taurina diminui a exploração na área próxima ao predador, enquanto que nos animais cotratados, a exploração não é alterada, contudo o número de episódios de avaliação de risco diminui, sugerindo uma resposta comportamental antipredatória (FONTANA et al., 2018a). Uma vez que o número de episódios de avaliação de risco foi similar tanto nos grupos tratados apenas com taurina como naqueles cotratados com etanol, foi sugerido que a taurina pode aumentar comportamentos antipredatórios em contextos aversivos, exercendo um papel complexo em domínios comportamentais distintos.

A taurina também é capaz de modular respostas relacionadas ao estresse em peixe-zebra, como alteração no nado vertical e o aumento de movimentos erráticos nos animais expostos à substância de alarme (SA) (MEZZOMO et al., 2019). O aumento nos níveis de proteínas carboniladas e de cortisol induzidos pela SA é prevenido pelo pré-tratamento com taurina 42 e 400 mg/L, respectivamente (MEZZOMO et al., 2019). Esses dados demonstram que a taurina desempenha um papel contra algumas alterações comportamentais, bioquímicas e fisiológicas desencadeadas pelo estresse agudo em peixes-zebra. Paralelamente, também foi demonstrado que a exposição aguda a taurina reduz o comportamento do tipo ansiedade no teste claro escuro (*e.g.*, aumenta o tempo gasto na área clara) em peixes-zebra (MEZZOMO et al., 2016). Contudo, nem a locomoção, e nem a atividade vertical exploratória são alterados pela taurina no teste do tanque novo (FONTANA et al., 2016). Em roedores, a administração aguda da taurina 43 mg/kg subcutânea (*s.c.*) também possui efeito ansiolítico no teste de labirinto em cruz elevado, enquanto que a suplementação crônica (0,05% na água de beber, por 4 semanas) resulta em efeito ansiogênico (EL IDRISSEI et al., 2009). Por outro lado, a taurina desempenha papel antidepressivo contra o estresse crônico leve e imprevisível (CUMS) (WU et al., 2017). Em geral, a administração de taurina 200 ou 500 mg/kg intraperitoneal (*i.p.*) por 35 dias, reverte alterações nos níveis de neurotransmissores (glutamato, serotonina, dopamina e noradrenalina) e do hormônio (corticosterona) no sangue e hipocampo de ratos submetidos ao CUMS (WU et al., 2017). A pré-administração de taurina também previne a redução no consumo de sacarose (anedonia) e alterações exploratórias desencadeadas por CUMS, indicando um efeito benéfico no comportamento do tipo-depressivo em ratos (WU et al., 2017). Em suma, os dados

pontuados acima evidenciam o papel neuroprotetor da taurina no SNC em diversos contextos. Desse modo, a taurina, torna-se uma molécula promissora para neutralizar as ações comportamentais e efeitos neuroquímicos do MK-801 em diferentes organismos modelo, incluindo o peixe-zebra, que foi utilizado no presente estudo.

3. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de modelos animais para o estudo de doenças neuropsiquiátricas complexas como a esquizofrenia, com preditiva validade, é de grande importância pois contribui para aumentar o conhecimento sobre a neurobiologia da doença e possibilita o desenvolvimento de novas drogas com melhor eficácia terapêutica (JONES, WATSON e FONE, 2011). Estudos indicam que a prevalência da esquizofrenia ao longo da vida é de aproximadamente 0,3–0,7 % embora possa haver variação, entre etnias distintas, países e por origem geográfica e migração (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; SAHA et al., 2005). Enquanto que os sintomas positivos da esquizofrenia são tratados atualmente em diversos graus, por antipsicóticos típicos e atípicos, os sintomas negativos e cognitivos dessa doença permanecem ainda resistentes ao tratamento (KEEFE, EESLEY e POE, 2005; NUECHTERLEIN et al., 2004). Além disso, o tratamento com antipsicóticos ainda produz muitos efeitos colaterais (*e.g.*, sintomas extrapiramidais), tais como tremores e rigidez muscular (JANNO et al., 2004). Apesar do tratamento com antipsicóticos atípicos não produzir sintomas extrapiramidais, o seu uso acarreta em alterações metabólicas (*e.g.*, ganho de peso, diabetes) e sanguíneas (*e.g.*, agranulocitose) (RAEDLER, 2010). Em geral, pacientes que sofrem de esquizofrenia e seus familiares experimentam uma redução dramática em sua qualidade de vida (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Nessa doença, a expectativa de vida é drasticamente reduzida, e essas pessoas vivem de 15 a 20 anos a menos do que pessoas saudáveis (AUQUIER et al., 2006; LAURSEN, NORDENTOFT e MORTENSEN, 2014). O excesso de mortalidade pode ser atribuído às altas taxas de suicídio e também ao maior risco de acidentes. Juntos, esses obstáculos indicam a necessidade de buscar moléculas neuroprotetoras que possam ter melhor eficácia no tratamento da esquizofrenia (JANNO et al., 2004; LI; SNYDER, VANOVER e 2016; MIYAMOTO et al., 2012). Nesse sentido, a taurina é uma substância potencial que vem sendo extensivamente estudada (EL IDRISSEI et al., 2009; JAKARIA et al., 2019; MENZIE et al., 2014; MEZZOMO et al., 2018; ROSEMBERG et al., 2012; SCHAFFER e KIM, 2018; SCHAFFER et al., 2010; WU et al., 2005). Estudos tem mostrado que a taurina é neuroprotetora e reduz a excitotoxicidade do glutamato (WU et al., 2005; YE, SHI e YIN, 2013), atua no controle e homeostase do cálcio intracelular (CHEN et al., 2001), possui propriedades antioxidantes (FONTANA et al., 2019; ROSEMBERG et al., 2010) e ação neuromoduladora (CHAN et al., 2014; WU et al., 2005). Devido a sua ação pleiotrópica no SNC, a taurina surge como uma molécula promissora para neutralizar os efeitos comportamentais e neuroquímicos do MK-801 em peixes-zebra (MEZZOMO et al., 2018).

Embora existam muitos estudos mostrando as propriedades benéficas da taurina a nível de SNC, apenas algumas evidências pontuam os efeitos da taurina na clínica da esquizofrenia (FIRTH et al., 2018; O'DONNELL et al., 2016; SAMUELSSON et al., 2013). Em seres humanos, as propriedades protetoras da taurina têm sido reportadas (FIRTH et al., 2018). Por exemplo, a suplementação com taurina (4g) por 12 semanas, atenua a sintomas de psicose e depressão em pacientes com o primeiro episódio de psicose (O'DONNELL et al., 2016). Foi demonstrado que os níveis de taurina no plasma sanguíneo de pacientes com esquizofrenia tratados com olanzapina eram maiores quando comparados com indivíduos saudáveis (SAMUELSSON et al., 2013). Juntos esses dados pontuam algumas evidências as quais indicam o papel preventivo da taurina como tratamento adjuntivo em transtornos psiquiátricos. Contudo o uso da taurina requer estudos futuros, particularmente no que se refere ao início de psicose e ao curso da esquizofrenia.

Em geral, os distúrbios neuropsiquiátricos e sua relação com o estresse, permanecem ainda pouco entendidos e representam um problema biomédico urgente (MCEWEN, 1993). Estudar os efeitos do estresse em humanos torna-se inviável devido a implicações éticas e metodológicas, nesse sentido, modelos alternativos tais como o peixe-zebra representam ótimas possibilidades (KALUEFF, STEWART e GERLAI, 2014). Além da alta sensibilidade para respostas comportamentais e fisiológicas de estresse, o peixe-zebra possui o eixo HPI que é funcionalmente e estruturalmente homólogo ao eixo HPA em mamíferos (ALSOP e VIJAYAN, 2009), emergindo com uma importante ferramenta para estudar papel do eixo HPI em modelos de doenças neuropsiquiátricas (DEMIN et al., 2020). Por fim, a utilização do peixe-zebra poderá auxiliar na descoberta de novas moléculas com potencial terapêutico para tratamento dessas desordens.

4. HIPÓTESES

- A exposição à taurina previne o déficit de memória e hiperlocomoção induzidos pelo MK-801 em peixe-zebra.
- A exposição à taurina previne alterações no comportamento social e nos níveis de cortisol em modelo déficit social induzido por MK-801 em peixe-zebra.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

- Avaliar o potencial neuroprotetor da taurina frente a fenótipos comportamentais relacionados à esquizofrenia induzidos por MK-801 em peixes-zebra.

5.2. Objetivos específicos

- Verificar o efeito da taurina frente ao déficit de memória e hiperlocomoção induzidos pelo MK-801 em peixes-zebra.
- Elucidar os efeitos da taurina no comportamento social e nos níveis de cortisol em modelo déficit social induzido por MK-801 em peixes-zebra.

6. DESENVOLVIMENTO

As metodologias utilizadas e os resultados desta tese estão demonstrados na forma de dois artigos científicos publicados em periódicos internacionais de relevante fator de impacto na área.

Artigo 1: foi publicado na revista *Neurochemistry International* (Qualis Referência CAPES A2, FI: 3.921) em 2021 e se intitula “Neuroprotective role of taurine on MK 801 induced memory impairment and hyperlocomotion in zebrafish”.

Artigo 2: foi publicado na revista *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* (Qualis Referência CAPES A1, FI: 5.067) em 2021 e se intitula “Taurine prevents MK-801-induced shoal dispersion and altered cortisol responses in zebrafish”.

ARTIGO 1

Neuroprotective role of taurine on MK-801-induced memory impairment and hyperlocomotion in zebrafish

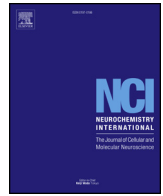
Francini Franscescon, Talise E. Müllera, Kanandra T. Bertoncello, Denis B. Rosemberg

Neurochemistry international (2020) May, 135:104710



Contents lists available at ScienceDirect

Neurochemistry International

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

Neuroprotective role of taurine on MK-801-induced memory impairment and hyperlocomotion in zebrafish

Francini Francescon^{a,b,**}, Talise E. Müller^{a,b}, Kanandra T. Bertencello^{a,b},
Denis B. Rosemberg^{a,b,c,*}

^a Laboratory of Experimental Neuropsychobiology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Natural and Exact Sciences Center, Federal University of Santa Maria, 1000 Roraima Avenue, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

^b Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, 1000 Roraima Avenue, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil

^c The International Zebrafish Neuroscience Research Consortium (ZNRC), 309 Palmer Court, Slidell, LA, 70458, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Neuroprotection
Glutamate excitotoxicity
Memory deficit
Inhibitory avoidance task
Schizophrenia
Zebrafish

ABSTRACT

Schizophrenia is a neuropsychiatric condition that reaches around 1% of people worldwide. Because taurine exerts a neuroprotective role in the brain, this molecule is a promising candidate to reduce schizophrenia-like symptoms. Here, we investigated a possible neuroprotective role of taurine against MK-801-induced memory deficit and hyperlocomotion in zebrafish using the inhibitory avoidance task and the novel tank diving test, respectively. First, we assessed the influence of different MK-801 doses (0.1, 0.3, 0.5, 1 and 2 mg/kg, i.p.) on memory consolidation. Although all MK-801 doses tend to reduce the retention index, only 2 mg/kg MK-801 showed robust amnesic effects. Then, we evaluated whether taurine pretreatments (42, 150 and 400 mg/L for 60 min) prevent MK-801-induced cognitive impairment. Immediately after the training, animals were exposed to non-chlorinated water or taurine and subsequently challenged with 2 mg/kg MK-801, i.p. The test session was performed 24 h after training. Although taurine alone did not change memory retention when compared with control, taurine pretreatments prevented MK-801-induced memory deficit. Importantly, no locomotor changes were observed 24 h after the training session. In the novel tank diving test, MK-801 induced hyperlocomotion and disrupted vertical activity, while 400 mg/L taurine pretreatment prevented these effects. Overall, our novel findings indicate a neuroprotective role of taurine against MK-801-induced memory deficit and hyperlocomotion, reinforcing the growing utility of zebrafish models to investigate the beneficial effects of different compounds against glutamate excitotoxicity.

1. Introduction

Schizophrenia is a neuropsychiatric condition characterized by various deleterious symptoms, such as perturbed thinking, loss of perception, altered behavior, and affection (Kahn et al., 2015). This disorder reaches around 1% of people worldwide (Mueser and McGurk, 2004), in which 98% of patients experience cognitive deficits, which comprise dysfunctions in verbal and visual learning, memory, attention, and difficulty in reasoning and solving problems (Heinrichs and Zakzanis, 1998; Keefe et al., 2005). Schizophrenia is considered one of the main causes of disability, with high costs of treatment (Desai et al., 2013; Świtaj et al., 2012). Although the etiology of schizophrenia is not

fully understood, dysfunctions of dopaminergic and glutamatergic systems can occur (Hu et al., 2015; Seibt et al., 2011; Wong and Van Tol, 2003). Because potential pharmacological treatments have been associated mainly with a modulatory role in dopaminergic pathway (Howes et al., 2012), the search for new therapeutic targets for treating schizophrenia is a challenge (Yang and Tsai, 2017).

The exposure to non-competitive N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor antagonists, such as dizocilpine maleate (MK-801), is a pharmacological strategy to elicit schizophrenia-like symptoms in animal models (Cadinu et al., 2018; Hu et al., 2015). NMDA receptors comprise a special subtype of ionotropic glutamatergic receptor involved in learning and memory processes, which can be found in distinct brain

* Corresponding author. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Natural and Exact Sciences Center, Federal University of Santa Maria, 1000 Roraima Avenue, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

** Corresponding author. Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, 1000 Roraima Avenue, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

E-mail addresses: francinifrancescon@gmail.com (F. Francescon), dbrosemberg@gmail.com (D.B. Rosemberg).

<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104710>

Received 5 December 2019; Received in revised form 16 January 2020; Accepted 20 February 2020

Available online 24 February 2020

0197-0186/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

structures, like amygdala and hippocampus (Ng et al., 2012; Riedel et al., 2003). The activation of NMDA receptors in the central nervous system (CNS) is essential for long-term potentiation and synaptic plasticity, showing positive effects on cognition (Lüscher and Malenka, 2012; Malenka and Nicoll, 1999). MK-801 is a non-competitive glutamatergic antagonist that binds to the NMDA receptor (Song et al., 2018). The inhibitory avoidance is a behavioral task employed to study memory-related processes (Gold, 1986; Izquierdo et al., 1995, 2002). In this task, animals learn to avoid an aversive stimulus (e.g., a pulsating electric shock) (Benetti and Izquierdo, 2013; Izquierdo et al., 1995; Pereira et al., 2001). Memory retention is usually tested 24 h after training by measuring the latency to enter the shock area of the apparatus (Izquierdo et al., 1995). Thus, the inhibitory avoidance task is one of the most studied protocols for measuring conditioned fear responses (Schmidt do Prado-Lima et al., 2011; Vianna et al., 2001), where retention is known as a form of explicit memory (Gold, 1986; Izquierdo and McGaugh, 2000). Using the inhibitory avoidance protocol, MK-801 impairs cognition when different animal models are tested (Bertoncello et al., 2019; Blank et al., 2009; da Silva et al., 2009; Monteiro Moreira et al., 2005; Seibt et al., 2011; van der Staay et al., 2011; Venable and Kelly, 1990). Thus, the exposure to MK-801 is an interesting strategy for modeling behavioral phenotypes that parallel those observed in schizophrenia, such as memory deficit (cognitive symptom) and hyperlocomotion (positive symptom), as well as to screen potential neuroprotective compounds (Mezzomo et al., 2018; Seibt et al., 2011).

Taurine (2-aminoethanesulfonic acid), is an abundant β -amino sulfonic acid in vertebrates, which plays a physiological role in osmoregulation, antioxidant activity, and membrane stability (Huxtable, 1992; Mezzomo et al., 2018; Rosemberg et al., 2010; Schaffer et al., 2010). This substance is synthesized from subsequent cysteine oxidation reactions and occurs in various tissues with high oxidative metabolism, such as brain, heart, and skeletal muscle (Huxtable, 1992; Vitvitsky et al., 2011). Mounting evidence supports that taurine acts as an inhibitory neuromodulator, counteracting glutamate excitotoxicity (Chan et al., 2014; Chen et al., 2001; Wu et al., 2005; Ye et al., 2013).

Similar to rodents, zebrafish exposed to MK-801 display stereotypic behaviors (e.g., circular swimming, hyperlocomotion, loss of social preference, and cognitive impairments) (Seibt et al., 2011, 2010; Sison and Gerlai, 2011; Swain et al., 2004; Zimmermann et al., 2016). Importantly, the expression of NMDA-related genes and excitatory amino acid transporters were characterized previously in zebrafish (Cox et al., 2005; Edwards and Michel, 2003, 2002; Rico et al., 2010; Tabor and Friedrich, 2008), reinforcing the evolutionarily conserved function of glutamatergic system to assess mechanisms underlying learning and memory. Thus, because MK-801 is a pharmacological model to elicit schizophrenia-like symptoms, and taurine is a promising molecule that counteracts glutamate excitotoxicity, we sought to investigate whether taurine prevents MK-801-induced memory impairment and hyperlocomotion in zebrafish.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Behavioral experiments were performed using zebrafish (*Danio rerio*) at 4 months of age (short fin phenotype), obtained from a local commercial supplier (Hobby Aquários, RS, Brazil). The zebrafish outbred population used here are expected to be genetically heterogeneous and to better represent the natural populations, thereby decreasing the effects of arbitrary genetic drift inherited traits (Lima et al., 2016; Parra et al., 2009; Speedie and Gerlai, 2008). The sample size used in the present study was calculated based on previous studies that assessed memory-related processes using the inhibitory avoidance task in the zebrafish model (Bertoncello et al., 2019; Blank et al., 2009). Pilot experiments showed that both male and female zebrafish

displayed significant memory retention 24 h after training, without differences between sexes (data not shown). Similarly, fish from both sexes do not differ in memory capacity when assessed short-term spatial memory and short-term fear memory (Fontana et al., 2019). Thus, animals from two independent batches were carefully distributed in the experimental groups in a 50:50% male:female ratio for the experiments.

2.2. Housing standards and randomization

Zebrafish were maintained in 40 L tanks at a maximum density of 4 fish per liter under standard conditions (water temperature set at 27 ± 2 °C, pH 7.0–7.2, conductivity 1500–1600 $\mu\text{S cm}^{-1}$). Fish were acclimated for 14 days before the experiments and kept in a room under a controlled light-dark photoperiod cycle (14/10 h, lights on 7:00 a.m.) and fed twice daily with a commercial fish flake food (Alcon BASIC™, Alcon, Brazil). All behavioral tasks were carried out in a fully randomized order. Fish were randomly allocated to the experimental groups with the aid of computerized random numbers (www.random.org). Three days before the experiments, animals were weighed and individually separated in partitioned Plexiglas tanks (50 cm \times 35 cm \times 6 cm – length \times width \times height) with small perforations, allowing free water circulation and visual contact between fish, minimizing the isolation stress (Ziani et al., 2018; Maximino et al., 2018; Bertoncello et al., 2019). This strategy facilitates the identification of each subject across the experimentation period. Behavioral data were further analyzed by a researcher blinded to the experimental condition of fish. All procedures were approved by the Ethics Commission on Animal Use of Federal University of Santa Maria (process number 6398060519).

2.3. Inhibitory avoidance apparatus

The inhibitory avoidance tank (30 cm length \times 10 cm height \times 10 cm width), was divided into two equally black and white compartments, separated by a manually operated guillotine-type partition (10 cm \times 10 cm) and filled with 1.3 L of non-chlorinated water. The black compartment contained three pairs of steel metal bars connected to an electric 12 V stimulator. The pairs of steel bars were adjusted to form an electric dipole, inverting the polarity after each electric stimulus. The shock frequency was set at 100 Hz (50 pulses of 5 ms every 500 ms), which induces a significant memory retention in zebrafish (Bertoncello et al., 2019).

2.4. Inhibitory avoidance task and pharmacological treatments

2.4.1. Training session

The inhibitory avoidance task was performed between 9:00 a.m. and 4:00 p.m. Zebrafish were individually placed on the white side of the apparatus at the training session. After 1 min of acclimation, the guillotine-type partition was partially open, allowing the animal to move freely in the apparatus. When zebrafish crossed to the black compartment of the tank, the sliding door was closed and a mild electric shock (3 ± 0.2 V, 100 Hz) was applied for 5 s. Then, the fish was immediately removed from the apparatus and the pharmacological treatments were performed. As exclusion criterion, fish which did not cross to the black side until 300 s were removed from the trial.

2.4.2. Pharmacological treatments

2.4.2.1. Effects of different MK-801 doses on memory consolidation. First, to verify the influence of different MK-801 doses on memory consolidation, animals were removed from the training session and then briefly anesthetized in cold water. Saline (PBS buffer, pH 7.4) or MK-801 (0.1, 0.3, 0.5, 1, and 2 mg/kg) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), were intraperitoneally (i.p.) injected using a BD ultra-fine™ 30 U syringe (needle size 6 mm \times 0.25 mm) (Richetti et al., 2011), with a volume of 10 μL (Kinkel et al., 2010). MK-801 was prepared using PBS

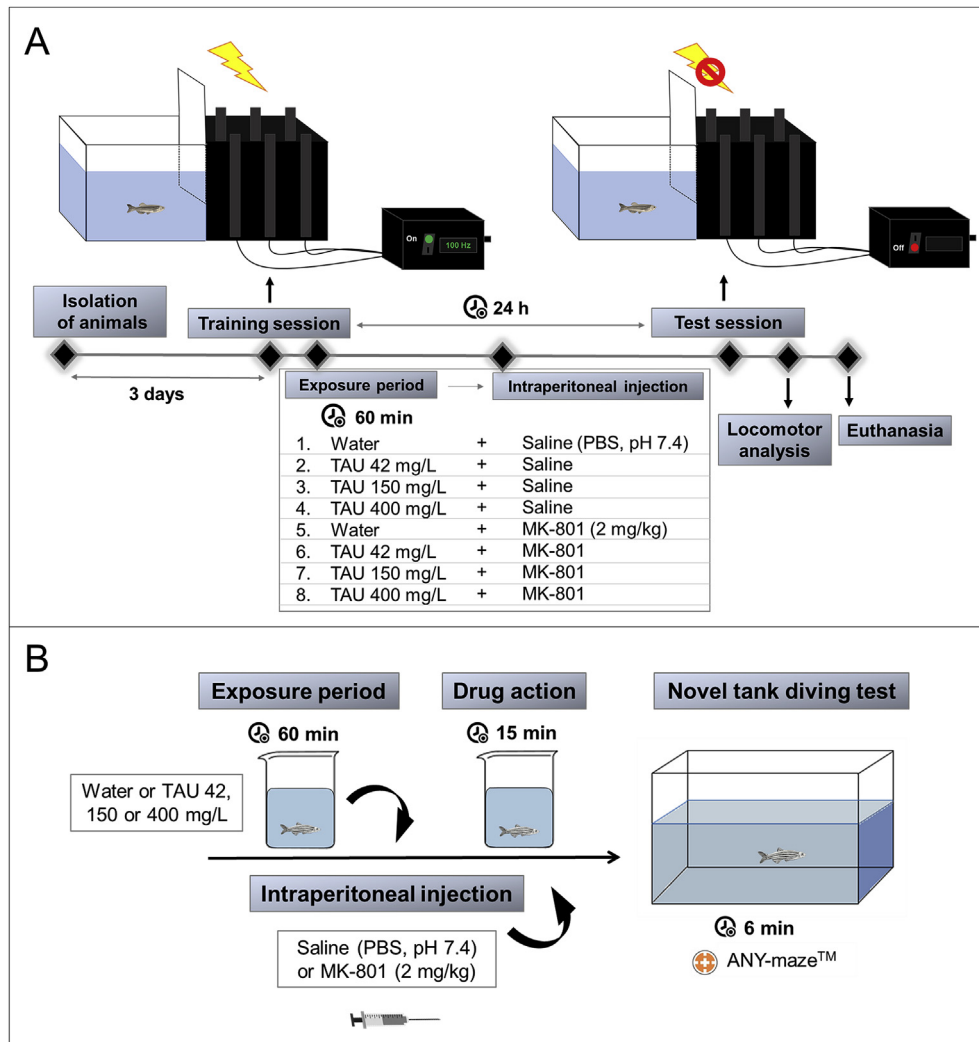


Fig. 1. Schematic illustration of the experimental design and pharmacological manipulations (A) Inhibitory avoidance protocol. (B) Novel tank diving test.

buffer pH 7.4 as vehicle. All fish were weighed and MK-801 solutions were prepared considering the average weight of the fish (0.4 g) as well as the volume of injection (10 μ L) for each dose tested. MK-801 doses were chosen based on previous data, which induced memory deficits in rodents (Castellano et al., 1999; da Silva et al., 2009; Monteiro Moreira et al., 2005; Venable and Kelly, 1990) and zebrafish (Bertoncello et al., 2019).

2.4.2.2. Effects of taurine and 2 mg/kg MK-801 on the inhibitory avoidance task. To assess taurine and MK-801 effects on memory consolidation, animals were exposed to taurine 42, 150 and 400 mg/L (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) or water (Fontana et al., 2018; Mezzomo et al., 2019, 2016; Rosemberg et al., 2012, 2010). For each treatment, zebrafish were individually exposed in 500 mL beakers for 60 min (Bertoncello et al., 2019; Rosemberg et al., 2012). Groups without taurine pretreatment (control and MK-801) were kept for 60 min in non-chlorinated water. Then, i.p. injections with saline (PBS) or MK-801 were administered. Animals were returned to the partitioned Plexiglas tanks until the test session, which was performed on the next day, 23 h after the i.p. injection (24 h after training session). Fig. 1A shows the experimental protocol and the apparatus used to assess aversive memory in zebrafish.

2.4.3. Test session

The test session was performed at 24 h after training. The protocol

was similar, except that no shock was administered when fish crossed to the black compartment of the apparatus. The latency to enter the dark area was measured and the differences between latencies from test and training sessions (in seconds) were calculated and expressed as retention indexes.

2.5. Influence of MK-801 on locomotor activity after the test session

To verify if changes in locomotion could influence the results observed in the inhibitory avoidance test, the distance traveled, immobile episodes, and absolute turn angle were evaluated immediately after the test section. Animals were individually placed in a glass tank (25 cm length \times 15 cm height \times 6 cm width) and their behavioral activities were recorded for 6 min, with a camera in a frontal position. Data were analyzed using the automated video-tracking software (ANY-Maze™, Stoelting, CO) (Bertoncello et al., 2019; Rosemberg et al., 2012) at 30 frames/s.

2.6. Novel tank diving test

To evaluate whether taurine prevents MK-801-induced hyperlocomotion, the locomotor and exploratory activity of fish were measured using the novel tank diving test (Egan et al., 2009; Rosemberg et al., 2012). Briefly, zebrafish were individually exposed to non-chlorinated water or taurine (42, 150 and 400 mg/L) in 500 mL beakers for 60 min

and then injected i.p. with 2 mg/kg of MK-801 or PBS pH 7.4. Behavior analyses were performed 15 min after MK-801 administration (Seibt et al., 2011).

The novel tank apparatus (25 cm length \times 15 cm height \times 11 cm width) was filled with 2.5 L of non-chlorinated water and divided into two equally-sized horizontal areas (top and bottom) to assess the vertical activity (Egan et al., 2009). Fish were placed individually in the apparatus and their behaviors were recorded for 6 min. Distance traveled, absolute turn angle, and immobile episodes were used as locomotion-related endpoints. The vertical exploration of zebrafish was analyzed by calculating the time spent in top area, transitions to top area, and the latency to enter the top area (Kalueff et al., 2013). All behaviors were measured using automated video-tracking system (ANY-Maze™, Stoelting, CO) at 30 frames/s. Fig. 1B shows the experimental design to assess positive schizophrenia-like phenotypes.

2.7. Statistics

Normality and homogeneity of variances were assessed by Kolmogorov-Smirnov and Bartlett's tests, respectively. Nonparametric data of latency were expressed as median \pm interquartile range and analyzed by Wilcoxon matched-pairs signed rank test. To analyze the effects of MK-801 on the retention index, one-way ANOVA was applied, followed by Dunnett's multiple comparisons test. To analyze the effects of taurine and MK-801 on the retention indexes and on locomotion-related endpoints, we run two-way ANOVA (MK-801 and taurine as factors), followed by Student-Newman-Keuls multiple comparisons test when appropriate. The level of significance was set at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. High MK-801 concentration impairs memory consolidation in zebrafish

First, we examined the effect of a single MK-801 intraperitoneal injection (0.1, 0.3, 0.5, 1, and 2 mg/kg) on memory consolidation. Wilcoxon matched-pairs signed rank test revealed an increased latency to enter the black compartment in test session for the control ($W = 94.00$, $p = 0.0013$), as well as for MK-801 groups at 0.1 ($W = 64.00$, $p = 0.0020$), 0.3 ($W = 50.00$, $p = 0.0244$), 0.5 ($W = 54.00$, $p = 0.0342$), and 1 mg/kg ($W = 48.00$, $p = 0.0313$) (Fig. 2A). Conversely, no differences between training and test sessions were observed in 2 mg/kg MK-801-treated fish. One-way ANOVA revealed a reduced retention index in 2 mg/kg MK-801 group when compared with control ($F_{(5, 66)} = 2485$; $p = 0.05$) (Fig. 2B). Thus, 2 mg/kg MK-801 was chosen for subsequent experiments.

3.2. Taurine prevents MK-801-induced memory consolidation impairment in zebrafish

Wilcoxon matched-pairs signed rank test revealed a robust increase in memory retention 24 h after training for control ($W = 81.00$, $p = 0.0024$), 42, 150, and 400 mg/L taurine ($W = 96.00$, $p = 0.0043$; $W = 120.0$, $p = 0.0001$; $W = 96.00$, $p = 0.0010$), as well their respective taurine-pretreated groups ($W = 82.00$, $p = 0.0071$; $W = 79.00$, $p = 0.0034$; $W = 73.00$, $p = 0.0081$) (Fig. 3A). Furthermore, two-way ANOVA yielded significant effects of taurine \times MK-801 interaction ($F_{(3, 104)} = 2773$; $p = 0.0452$), and MK-801 ($F_{(1, 104)} = 4421$; $p = 0.0379$) for the retention index (Fig. 3B). Interestingly, taurine alone did not alter memory retention in comparison to control. Post-hoc analyses yielded significant differences between 42 and 150 mg/L taurine-pretreated groups when compared with MK-801 alone, showing a preventive effect against MK-801-induced memory deficit. Conversely, 400 mg/L taurine pretreatment attenuated the effect of MK-801 on memory consolidation.

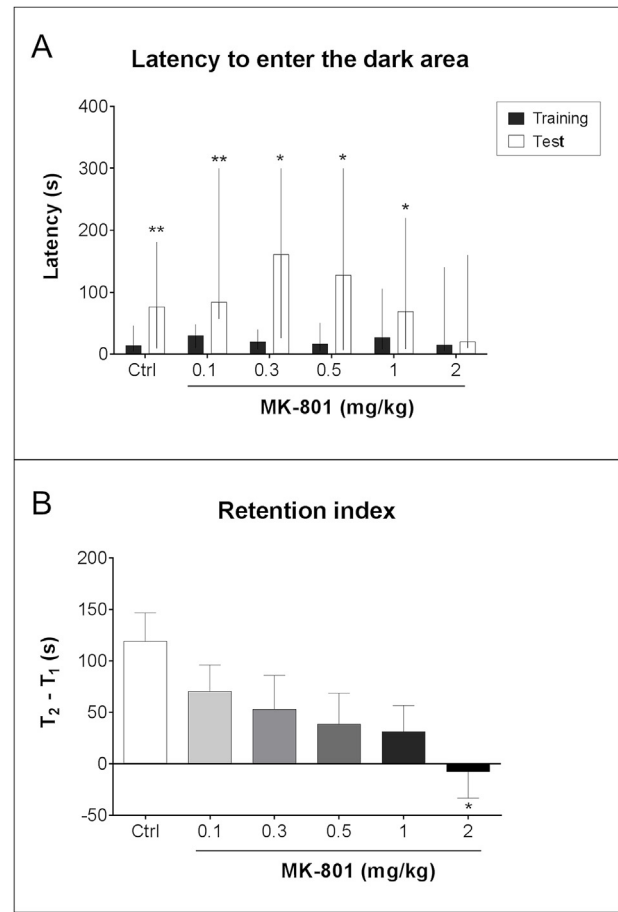


Fig. 2. Effect of various MK-801 doses (0.1, 0.3, 0.5, 1.0 and 2 mg/kg) on the aversive memory of zebrafish tested in the inhibitory avoidance task. (A) Latency to enter the dark area in training and test sessions. Data were expressed as median \pm interquartile range and analyzed by Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Asterisks denote significant differences between training and test sessions for each experimental group. (B) Memory retention indexes. Data were expressed as means \pm S.E.M and analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test. The asterisk denotes significant difference when compared with control ($n = 11$ – 13 per group; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$).

3.3. Taurine and MK-801 do not alter locomotion after the test session

Fig. 4 shows the influence of each treatment on locomotion-related parameters after the test session. Two-way ANOVA revealed that taurine and MK-801 did not alter distance traveled, absolute turn angle, as well as the immobile episodes when compared with control group.

3.4. Taurine prevents MK-801-induced hyperlocomotion in zebrafish

Fig. 5 shows the effects of taurine and MK-801 on locomotion and vertical activity in the novel tank diving test. For distance traveled, two-way ANOVA revealed a significant effects of taurine \times MK-801 interaction ($F_{(3, 117)} = 3.859$, $p = 0.0113$) and MK-801 ($F_{(1, 117)} = 9.400$, $p = 0.0027$). Post-hoc analyses showed that MK-801 significantly increased distance traveled when compared with control, and 400 mg/L taurine pretreatment prevented MK-801-induced hyperlocomotion. The absolute turn angle and the number of immobile episodes did not change (Fig. 5A). Fig. 5B shows the effects of taurine and MK-801 on vertical exploration. Two-way ANOVA of the time spent in top area revealed significant effects of taurine \times MK-801 interaction ($F_{(3, 116)} = 2.821$, $p = 0.0420$) and MK-801 ($F_{(1, 116)} = 29.76$, $p < 0.0001$). Basically, 400 mg/L taurine pretreatment abolished the increased time

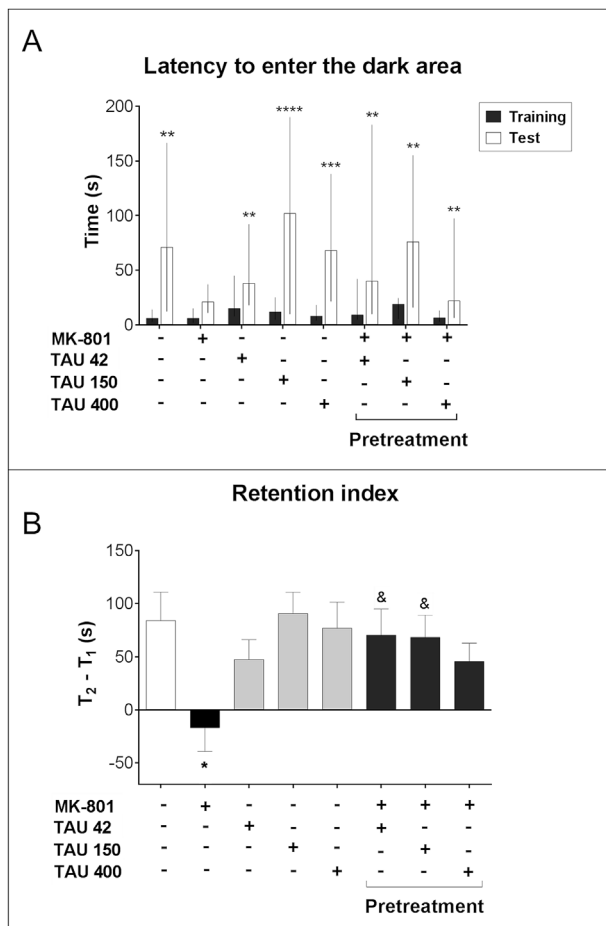


Fig. 3. Neuroprotective effect of taurine against MK-801-induced memory impairment in zebrafish. (A) Latency to enter the dark area in training and test sessions. Data were expressed as median \pm interquartile range and analyzed by Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Asterisks denote significant differences between training and test sessions for each experimental group. (B) Memory retention indexes. Data were expressed as means \pm S.E.M. and analyzed by two-way ANOVA (MK-801 and taurine as factors), followed by the Student-Newman-Keuls multiple comparison test when necessary. Asterisks denote significant difference when compared with control and symbols (&) represent significant differences compared with MK-801 group ($n = 13$ – 15 per group; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; & $p < 0.05$).

spent in top area observed in MK-801 group. Both transitions to top area and the latency to enter the top did not change between groups.

4. Discussion

In this study, we show for the first time the neuroprotective effects of taurine on MK-801-induced schizophrenia-like symptoms in zebrafish. As an antagonist of NMDA receptors, the highest MK-801 dose tested (2 mg/kg) induced cognitive deficit and stereotypic behaviors in zebrafish. Interestingly, taurine showed robust preventive effects against MK-801-induced memory impairment and hyperlocomotion, thereby reinforcing its beneficial roles in the brain.

The involvement of glutamate signaling in learning and memory, synaptic plasticity, and long-term potentiation have been extensively described (Gasbarri and Pompili, 2014; McEntee and Crook, 1993; Riedel et al., 2003; Riedel and Reymann, 1996). Mounting evidence shows that NMDA-receptor inactivation causes memory impairment and may cause hyperlocomotion in both zebrafish (Seibt et al., 2011) and rodents (Riedel et al., 2003; van der Staay et al., 2011). Previous data have shown that a single MK-801 exposure immediately after the training session causes memory deficit (Blank et al., 2009; Seibt et al., 2011). Likewise, four days of exposure to 20 μ M MK-801 impairs memory acquisition in this model (Ng et al., 2012). Importantly, these previous works have used MK-801 (at 5 and 20 μ M) dissolved in the tank water, whereas we administered the drug intraperitoneally. Despite lower MK-801 doses did not induce memory impairment, we verified a gradual reduction in the retention index, with a significant effect at 2 mg/kg, suggesting a dose-dependent response. Due to the well-known differences in terms of metabolism, comparing the effective concentrations of a certain drug administered by various routes (e.g., immersion and i.p. injection) is often difficult. Nonetheless, we verified that 2 mg/kg MK-801 replicate the memory deficit and stereotypic behaviors (hyperlocomotion and disrupted vertical swimming activity) observed when zebrafish are exposed to 20 μ M MK-801 in the tank water, supporting a similar biological response. Importantly, our data corroborate the MK-801-induced phenotypes observed in both mice and zebrafish (Bertocello et al., 2019; Castellano et al., 1999; Seibt et al., 2011), reinforcing the key role of glutamatergic pathway on cognitive and positive symptoms of schizophrenia.

The exposure to high MK-801 concentrations can promote stereotypic behaviors, such as hyperlocomotion and circular swimming (Sison and Gerlai, 2011; Swain et al., 2004). Using the novel tank diving test, we observed increased locomotion and time spent in top area in 2 mg/kg MK-801 group, while 400 mg/L taurine pretreatment showed protective effects. Because memory assessment in animal models depends on locomotion (Sison and Gerlai, 2011), we further verified whether

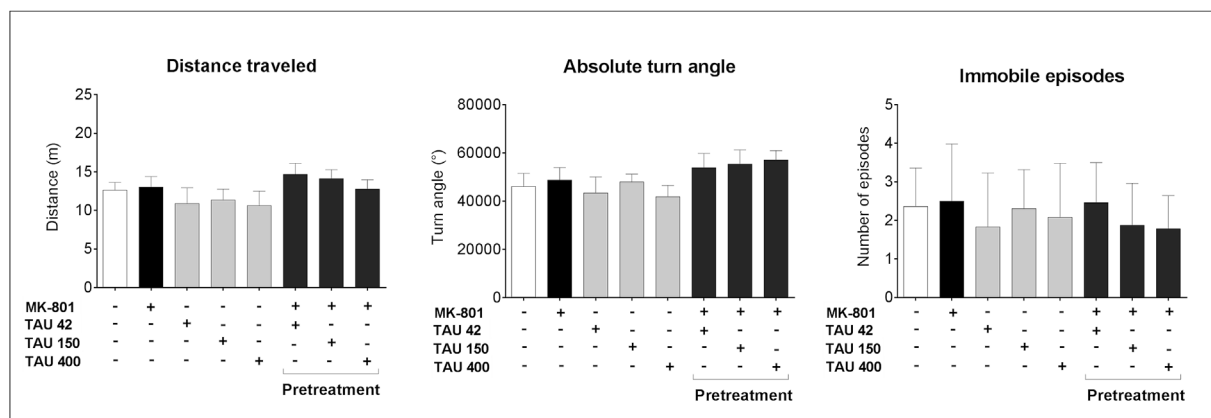


Fig. 4. Taurine and MK-801 do not affect locomotion 24 h after the training session. The following locomotion-related parameters were measured: distance traveled, immobile episodes, and absolute turn angle. Data were expressed as mean \pm S.E.M. and analyzed by two-way ANOVA (MK-801 and taurine as factors). Statistical significance was set at $p \leq 0.05$ ($n = 13$ – 15 per group).

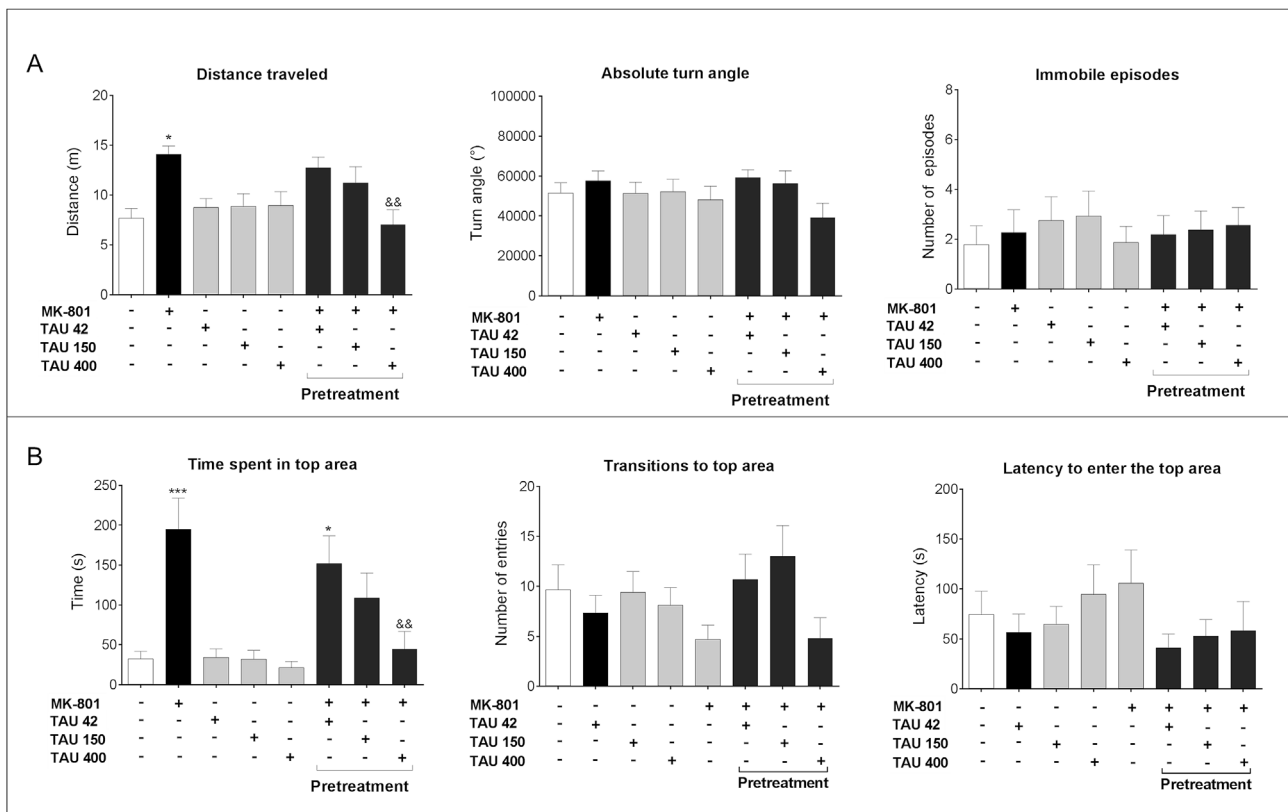


Fig. 5. Neuroprotective effects of taurine on MK-801-induced stereotypic behaviors in zebrafish. (A) Locomotion-related endpoints, measured by the distance traveled, absolute turn angle, and immobile episodes. (B) Vertical exploration, assessed by the time spent in top area, transitions to top area, and latency to enter the top area. Data were expressed as mean \pm S.E.M. and analyzed by two-way ANOVA (MK-801 and taurine as factors) followed by the Student-Newman-Keuls multiple comparison test when necessary. Asterisks denote significant differences when compared with control, while symbols (&) represent significant differences compared with MK-801 alone ($n = 14-17$ per group; * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; && $p < 0.01$).

2 mg/kg MK-801 affects behavioral performance 24 h after the training session. Similar to our findings, although MK-801 exposure (ranging from 15 to 60 min) increases locomotion (Seibt et al., 2010), no significant effects on locomotion-related parameters were verified immediately after the test session, supporting the memory consolidation deficit. Despite MK-801 pharmacokinetics is still unknown in zebrafish, a short half-life is observed in rodents, in which MK-801 can be detectable in the brain until 4 h after i.p. administration (Wegener et al., 2011). Thus, the distinct effects on locomotion observed 15 min and 23 h after MK-801 i.p. injection could be attributed to a possible MK-801 short half-life in zebrafish. Notably, these findings exclude the influence of locomotor changes in the inhibitory avoidance response corroborating previous data, which showed that the respective time interval is sufficient for zebrafish recovery from drug effects on motor behaviors (Sison and Gerlai, 2011).

Due to the pleiotropic action in the brain, taurine has been considered a potential therapeutic molecule for treating neurological and neuropsychiatric disorders (Jakaria et al., 2019; Mezzomo et al., 2018). Because taurine can act as an inhibitory neuromodulator in the CNS, a preventive effect against glutamate-induced neuronal damage has been proposed (Chen et al., 2001; Jakaria et al., 2019; Wu et al., 2005; Ye et al., 2013). This fact is particularly important because glutamate excitotoxicity is related to brain injuries and neurodegenerative disorders (Greenamyre, 1986). Schizophrenic patients treated with olanzapine presents higher taurine levels in the blood plasma when compared with healthy individuals (Samuelsson et al., 2013). Electrophysiological data have shown that taurine modulates NMDA receptors through multiple mechanisms, thereby inhibiting NMDA evoked-responses (Chan et al., 2014). We hypothesize that taurine reduces MK-801-induced memory deficit and promotes stereotypic behaviors not only via direct

interaction with NMDA receptors but also via its neuromodulatory role in the brain. Taurine potentiates the inhibitory signaling as an agonist of GABA_A and glycine receptors (Song et al., 2012), promoting Cl⁻ influx (Okamoto et al., 1983a, 1983b). Likewise, taurine prevents glutamate-induced membrane depolarization, as well as inhibits the calcium influx through of L-, P/Q-, N-type voltage-gated calcium channels (Wu et al., 2005). Moreover, because taurine alone and taurine-pretreated fish did not show significant changes in locomotion, our data reinforce the neuroprotective role of taurine in memory-related processes.

5. Conclusion

In summary, our novel findings report the neuroprotective effects of taurine against MK-801-induced memory consolidation deficit and hyperlocomotion. Importantly, the preventive role of taurine described here can be attributed to a beneficial effect on memory consolidation, since no locomotor alterations 24 h after the training session were observed. Although further studies to elucidate the neurochemical mechanisms underlying the effects of taurine on MK-801-induced memory impairments are needed, our data support the use of zebrafish models as emergent tools to investigate the neuroprotective role of different compounds that counteract glutamate excitotoxicity.

Declaration of competing interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Finance code 001 for their financial support. F.F and T.E.M., receive CAPES fellowship grants – process number 88882.182160/2018-01 and 88882.182130/2018-01, respectively. K.T.B receives a CNPq fellowship grant. D.B.R receives the CNPq research productivity grant (process number 305051/2018-0) and his work is supported by PROEX/CAPES fellowship grant (process number 23038.004173/2019–93). The funders had no role in study design, data collection, and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- Benetti, F., Izquierdo, I., 2013. Histamine infused into basolateral amygdala enhances memory consolidation of inhibitory avoidance. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16, 1539–1545. <https://doi.org/10.1017/S1461145712001514>.
- Bertoncello, K.T., Müller, T.E., Fontana, B.D., Franscescon, F., Filho, G.L.B., Rosemberg, D.B., 2019. Taurine prevents memory consolidation deficits in a novel alcohol-induced blackout model in zebrafish. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 93, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.pnpb.2019.03.006>.
- Blank, M., Guerin, L.D., Cordeiro, R.F., Vianna, M.R.M., 2009. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 92, 529–534. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.07.001>.
- Cadinu, D., Grayson, B., Podda, G., Harte, M.K., Doostdar, N., Neill, J.C., 2018. NMDA receptor antagonist rodent models for cognition in schizophrenia and identification of novel drug treatments, an update. *Neuropharmacology* 142, 41–62. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.11.045>.
- Castellano, C., Cestari, V., Ciamei, A., Pavone, F., 1999. MK-801-induced disruptions of one-trial inhibitory avoidance are potentiated by stress and reversed by naltrexone. *Neurobiol. Learn. Mem.* 72, 215–229. <https://doi.org/10.1006/nlme.1999.3908>.
- Chan, C.Y., Sun, H.S., Shah, S.M., Agovic, M.S., Friedman, E., Banerjee, S.P., 2014. Modes of direct modulation by taurine of the glutamate NMDA receptor in rat cortex. *Eur. J. Pharmacol.* 728, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.01.025>.
- Chen, W.Q., Jin, H., Nguyen, M., Carr, J., Lee, Y.J., Hsu, C.C., Faiman, M.D., Schloss, J.V., Wu, J.Y., 2001. Role of taurine in regulation of intracellular calcium level and neuroprotective function in cultured neurons. *J. Neurosci. Res.* 66, 612–619. <https://doi.org/10.1002/jnr.10027>.
- Cox, J.A., Kucenas, S., Voigt, M.M., 2005. Molecular characterization and embryonic expression of the family of N-methyl-D-aspartate receptor subunit genes in the zebrafish. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 234, 756–766. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20532>.
- da Silva, A.L., Silva Martins, B., de M, da Linck V., Herrmann, A.P., Mai, N., Nunes, D.S., Elisabetsky, E., 2009. MK801- and scopolamine-induced amnesias are reversed by an Amazonian herbal locally used as a “brain tonic”. *Psychopharmacology* 202, 165–172. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1272-y>.
- Desai, P.R., Lawson, K.A., Barner, J.C., Rascati, K.L., 2013. Estimating the Direct and Indirect Costs For Community-Dwelling Patients with Schizophrenia 4. pp. 187–194. <https://doi.org/10.1111/jphs.12027>.
- Edwards, J.G., Michel, W.C., 2003. Pharmacological characterization of ionotropic glutamate receptors in the zebrafish olfactory bulb. *Neuroscience* 122, 1037–1047. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(03\)00544-x](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00544-x).
- Edwards, J.G., Michel, W.C., 2002. Odor-stimulated glutamatergic neurotransmission in the zebrafish olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 454, 294–309. <https://doi.org/10.1002/cne.10445>.
- Egan, R.J., Bergner, C.L., Hart, P.C., Cachat, J.M., Canavello, P.R., Elegante, M.F., Elkhayat, S.I., Bartels, B.K., Tien, A.K., Tien, D.H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z., Kalueff, A.V., 2009. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 205, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022>.
- Fontana, B.D., Cleal, M., Parker, M.O., 2019. Female adult zebrafish (*Danio rerio*) show higher levels of anxiety-like behavior than males, but do not differ in learning and memory capacity. *Eur. J. Neurosci.* <https://doi.org/10.1111/ejn.14588>.
- Fontana, B.D., Stefanello, F.V., Mezzomo, N.J., Müller, T.E., Quadros, V.A., Parker, M.O., Rico, E.P., Rosemberg, D.B., 2018. Taurine modulates acute ethanol-induced social behavioral deficits and fear responses in adult zebrafish. *J. Psychiatr.* Res. 104, 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2018.08.008>.
- Gasbarri, A., Pompili, A., 2014. Involvement of glutamate in learning and memory. In: Menezes, A. (Ed.), *Identification of Neural Markers Accompanying Memory*. Elsevier, pp. 63–67. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408139-0.00004-3>.
- Gold, P.E., 1986. The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behav. Neural Biol.* 46, 87–98. [https://doi.org/10.1016/s0163-1047\(86\)90927-1](https://doi.org/10.1016/s0163-1047(86)90927-1).
- Greenamyre, J.T., 1986. The role of glutamate in neurotransmission and in neurologic disease. *Arch. Neurol.* 43, 1058–1063. <https://doi.org/10.1001/archneur.1986.00520100062016>.
- Heinrichs, R.W., Zakzanis, K.K., 1998. Neurocognitive deficit in schizophrenia: a quantitative review of the evidence. *Neuropsychology* 12, 426–445.
- Howes, O.D., Kambeitz, J., Kim, E., Stahl, D., Slifstein, M., Abi-Dargham, A., Kapur, S., 2012. The nature of dopamine dysfunction in schizophrenia and what this means for treatment. *Arch. Gen. Psychiatr.* 69, 776–786. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2012.169>.
- Hu, W., MacDonald, M.L., Elswick, D.E., Sweet, R.A., 2015. The glutamate hypothesis of schizophrenia: evidence from human brain tissue studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1338, 38–57. <https://doi.org/10.1111/nyas.12547>.
- Huxtable, R.J., 1992. Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* 72, 101–163. <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.1.101>.
- Izquierdo, I., Fin, C., Schmitz, P.K., Da Silva, R.C., Jerusalinsky, D., Quillfeldt, J.A., Ferreira, M.B., Medina, J.H., Bazan, N.G., 1995. Memory enhancement by intrahippocampal, intraamygdala, or intraentorhinal infusion of platelet-activating factor measured in an inhibitory avoidance task. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 5047–5051. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.11.5047>.
- Izquierdo, I., McGaugh, J.L., 2000. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behav. Pharmacol.* 11, 517–534. <https://doi.org/10.1097/00008877-200011000-00001>.
- Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Vianna, M.R.M., Coitinho, A., deDavid e Silva, T., Choi, H., Moletta, B., Medina, J.H., Izquierdo, I., 2002. Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22, 269–287. <https://doi.org/10.1023/a:1020715800956>.
- Jakaria, M., Azam, S., Haque, M.E., Jo, S.-H., Uddin, M.S., Kim, I.-S., Choi, D.-K., 2019. Taurine and its analogs in neurological disorders: focus on therapeutic potential and molecular mechanisms. *Redox Biol.* 24, 101223. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101223>.
- Kahn, R.S., Sommer, I.E., Murray, R.M., Meyer-Lindenberg, A., Weinberger, D.R., Cannon, T.D., O'Donovan, M., Correll, C.U., Kane, J.M., van Os, J., Insel, T.R., 2015. Schizophrenia. *Nat. Rev. Dis. Primer* 1, 15067. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.67>.
- Kalueff, A.V., Gebhardt, M., Stewart, A.M., Cachat, J.M., Brimmer, M., Chawla, J.S., Craddock, C., Kyzar, E.J., Roth, A., Landsman, S., Gaikwad, S., Robinson, K., Baatrup, E., Tierney, K., Shamchuk, A., Norton, W., Miller, N., Nicolson, T., Braubach, O., Gilman, C.P., Pittman, J., Rosemberg, D.B., Gerlai, R., Echevarria, D., Lamb, E., Neuhaus, S.C.F., Weng, W., Bally-Cuif, L., Schneider, H., Zebrafish Neuroscience Research Consortium, 2013. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish* 10, 70–86. <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0861>.
- Keefe, R.S.E., Eesley, C.E., Poe, M.P., 2005. Defining a cognitive function decrement in schizophrenia. *Biol. Psychiatr.* 57, 688–691. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.01.003>.
- Kinkel, M.D., Eames, S.C., Philipson, L.H., Prince, V.E., 2010. Intraperitoneal injection into adult zebrafish. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/2126>.
- Lima, M.G., Silva, R.X.do C., Silva, S.de.N.d.S., Rodrigues, L., do, S.D.S., Oliveira, K.R.H.M., Batista, E.de.J.O., Maximino, C., Herculano, A.M., 2016. Time-dependent sensitization of stress responses in zebrafish: a putative model for post-traumatic stress disorder. *Behav. Process.* 128, 70–82. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2016.04.009>.
- Lüscher, C., Malenka, R.C., 2012. NMDA receptor-dependent long-term potentiation and long-term depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005710>.
- Malenka, R.C., Nicoll, R.A., 1999. Long-term potentiation—a decade of progress? *Science* 285, 1870–1874. <https://doi.org/10.1126/science.285.5435.1870>.
- Maximino, C., Meinerz, D.L., Fontana, B.D., Mezzomo, N.J., Stefanello, F.V., de S Prestes, A., Batista, C.B., Rubin, M.A., Barbosa, N.V., Rocha, J.B.T., Lima, M.G., Rosemberg, D.B., 2018. Extending the analysis of zebrafish behavioral endophenotypes for modeling psychiatric disorders: fear conditioning to conspecific alarm response. *Behav. Process.* 149, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.01.020>.
- McEntee, W.J., Crook, T.H., 1993. Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology* 111, 391–401. <https://doi.org/10.1007/bf02253527>.
- Mezzomo, N.J., Fontana, B.D., Kalueff, A.V., Barcellos, L.J.G., Rosemberg, D.B., 2018. Understanding taurine CNS activity using alternative zebrafish models. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 90, 471–485. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.04.012>.
- Mezzomo, N.J., Fontana, B.D., Müller, T.E., Duarte, T., Quadros, V.A., Canzian, J., Pompermaier, A., Soares, S.M., Koakoski, G., Loro, V.L., Rosemberg, D.B., Barcellos, L.J.G., 2019. Taurine modulates the stress response in zebrafish. *Horm. Behav.* 109, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2019.02.006>.
- Mezzomo, N.J., Silveira, A., Giuliani, G.S., Quadros, V.A., Rosemberg, D.B., 2016. The role of taurine on anxiety-like behaviors in zebrafish: a comparative study using the novel tank and the light-dark tasks. *Neurosci. Lett.* 613, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.12.037>.
- Monteiro Moreira, K., Lima Ferreira, T., Vecchio Fornari, R., Perez Figueredo, L.Z., Menezes Oliveira, M.G., 2005. Interaction between M1-muscarinic and glutamatergic NMDA receptors on an inhibitory avoidance task. *Brain Res. Bull.* 67, 504–508. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2005.07.019>.
- Mueser, K.T., McGurk, S.R., 2004. Schizophrenia. *Lancet Lond. Engl.* 363, 2063–2072. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16458-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16458-1).
- Ng, M.-C., Hsu, C.-P., Wu, Y.-J., Wu, S.-Y., Yang, Y.-L., Lu, K.-T., 2012. Effect of MK-801-induced impairment of inhibitory avoidance learning in zebrafish via inactivation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in telencephalon. *Fish Physiol. Biochem.* 38, 1099–1106. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9595-8>.
- Okamoto, K., Kimura, H., Sakai, Y., 1983a. Taurine-induced increase of the Cl-conductance of cerebellar Purkinje cell dendrites in vitro. *Brain Res.* 259, 319–323. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)91266-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)91266-0).
- Okamoto, K., Kimura, H., Sakai, Y., 1983b. Evidence for taurine as an inhibitory neurotransmitter in cerebellar stellate interneurons: selective antagonism by TAG (6-aminomethyl-3-methyl-4H,1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide). *Brain Res.* 265, 163–168. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(83\)91350-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(83)91350-1).

- Parra, K.V., Adrian, J.C., Gerlai, R., 2009. The synthetic substance hypoxanthine 3-N-oxide elicits alarm reactions in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 205, 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.037>.
- Pereira, P., Ardenghi, P., de Souza, M.M., Choi, H., Moletta, B., Izquierdo, I., 2001. Effects of infusions of the tyrosine kinase inhibitor radicicol into the hippocampus on short- and long-term memory of the inhibitory avoidance task. *Behav. Pharmacol.* 12, 299–302. <https://doi.org/10.1097/00008877-200107000-00009>.
- Richetti, S.K., Blank, M., Capiotti, K.M., Piato, A.L., Bogo, M.R., Vianna, M.R., Bonan, C.D., 2011. Quercetin and rutin prevent scopolamine-induced memory impairment in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 217, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.09.027>.
- Rico, E.P., de Oliveira, D.L., Rosemberg, D.B., Mussulini, B.H., Bonan, C.D., Dias, R.D., Wofchuk, S., Souza, D.O., Bogo, M.R., 2010. Expression and functional analysis of Na (+)-dependent glutamate transporters from zebrafish brain. *Brain Res. Bull.* 81, 517–523. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.11.011>.
- Riedel, G., Platt, B., Micheau, J., 2003. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav. Brain Res.* 140, 1–47.
- Riedel, G., Reyman, K.G., 1996. Metabotropic glutamate receptors in hippocampal long-term potentiation and learning and memory. *Acta Physiol. Scand.* 157, 1–19. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.1996.484231000.x>.
- Rosemberg, D.B., Braga, M.M., Rico, E.P., Loss, C.M., Córdova, S.D., Mussulini, B.H.M., Blaser, R.E., Leite, C.E., Campos, M.M., Dias, R.D., Calcagnotto, M.E., de Oliveira, D.L., Souza, D.O., 2012. Behavioral effects of taurine pretreatment in zebrafish acutely exposed to ethanol. *Neuropharmacology* 63, 613–623. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.05.009>.
- Rosemberg, D.B., da Rocha, R.F., Rico, E.P., Zanotto-Filho, A., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Moreira, J.C.F., Klamt, F., Souza, D.O., 2010. Taurine prevents enhancement of acetylcholinesterase activity induced by acute ethanol exposure and decreases the level of markers of oxidative stress in zebrafish brain. *Neuroscience* 171, 683–692. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.09.030>.
- Samuelsson, M., Skogh, E., Lundberg, K., Vrethem, M., Öllinger, K., 2013. Taurine and glutathione in plasma and cerebrospinal fluid in olanzapine treated patients with schizophrenia. *Psychiatr. Res.* 210, 819–824. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2013.09.014>.
- Schaffer, S.W., Jong, C.J., Ramila, K.C., Azuma, J., 2010. Physiological roles of taurine in heart and muscle. *J. Biomed. Sci.* 17 (Suppl. 1), S2. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-S1-S2>.
- Schmidt do Prado-Lima, P.A., Perrenoud, M.F., Kristensen, C.H., Cammarota, M., Izquierdo, I., 2011. Topiramate diminishes fear memory consolidation and extinguishes conditioned fear in rats. *J. Psychiatry Neurosci. JPN* 36, 250–255. <https://doi.org/10.1503/jpn.100115>.
- Seibt, K.J., Oliveira, R.da L., Zimmermann, F.F., Capiotti, K.M., Bogo, M.R., Ghisleni, G., Bonan, C.D., 2010. Antipsychotic drugs prevent the motor hyperactivity induced by psychotomimetic MK-801 in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 214, 417–422. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.06.014>.
- Seibt, K.J., Piato, A.L., da Luz Oliveira, R., Capiotti, K.M., Vianna, M.R., Bonan, C.D., 2011. Antipsychotic drugs reverse MK-801-induced cognitive and social interaction deficits in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 224, 135–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.05.034>.
- Sison, M., Gerlai, R., 2011. Behavioral performance altering effects of MK-801 in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 220, 331–337. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.02.019>.
- Song, N.-Y., Shi, H.-B., Li, C.-Y., Yin, S.-K., 2012. Interaction between taurine and GABA(A)/glycine receptors in neurons of the rat anteroventral cochlear nucleus. *Brain Res.* 1472, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.07.001>.
- Song, X., Jensen, M.Ø., Jogini, V., Stein, R.A., Lee, C.-H., Mchaourab, H.S., Shaw, D.E., Gouaux, E., 2018. Mechanism of NMDA receptor channel block by MK-801 and memantine. *Nature* 556, 515–519. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0039-9>.
- Speedie, N., Gerlai, R., 2008. Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 188, 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.10.031>.
- Swain, H.A., Sigstad, C., Scalzo, F.M., 2004. Effects of dizocilpine (MK-801) on circling behavior, swimming activity, and place preference in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol. Teratol.* 26, 725–729. <https://doi.org/10.1016/j.nt.2004.06.009>.
- Świtaj, P., Anczewska, M., Chrostek, A., Sabariego, C., Cieza, A., Bickenbach, J., Chatterji, S., 2012. Disability and schizophrenia: a systematic review of experienced psychosocial difficulties. *BMC Psychiatr.* 12, 193. <https://doi.org/10.1186/1471-244X-12-193>.
- Tabor, R., Friedrich, R.W., 2008. Pharmacological analysis of ionotropic glutamate receptor function in neuronal circuits of the zebrafish olfactory bulb. *PLoS One* 3, e1416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001416>.
- van der Staay, F.J., Rutten, K., Erb, C., Blokland, A., 2011. Effects of the cognition impairer MK-801 on learning and memory in mice and rats. *Behav. Brain Res.* 220, 215–229. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.01.052>.
- Venable, N., Kelly, P.H., 1990. Effects of NMDA receptor antagonists on passive avoidance learning and retrieval in rats and mice. *Psychopharmacology* 100, 215–221. <https://doi.org/10.1007/bf02244409>.
- Vianna, M.R., Izquierdo, L.A., Barros, D.M., de Souza, M.M., Rodrigues, C., Sant'Anna, M.K., Medina, J.H., Izquierdo, I., 2001. Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* 34, 233–240. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2001000200011>.
- Vitvitsky, V., Garg, S.K., Banerjee, R., 2011. Taurine biosynthesis by neurons and astrocytes. *J. Biol. Chem.* 286, 32002–32010. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.253344>.
- Wegener, N., Nagel, J., Gross, R., Chambon, C., Greco, S., Pietraszek, M., Gravius, A., Danysz, W., 2011. Evaluation of brain pharmacokinetics of (+)MK-801 in relation to behaviour. *Neurosci. Lett.* 503, 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.08.012>.
- Wong, A.H.C., Van Tol, H.H.M., 2003. Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 269–306.
- Wu, H., Jin, Y., Wei, J., Jin, H., Sha, D., Wu, J.-Y., 2005. Mode of action of taurine as a neuroprotector. *Brain Res.* 1038, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.01.058>.
- Yang, A.C., Tsai, S.-J., 2017. New targets for schizophrenia treatment beyond the dopamine hypothesis. *Int. J. Mol. Sci.* 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18081689>.
- Ye, H.-B., Shi, H.-B., Yin, S.-K., 2013. Mechanisms underlying taurine protection against glutamate-induced neurotoxicity. *Can. J. Neurol. Sci. J. Can. Sci. Neurol.* 40, 628–634.
- Ziani, P.R., Müller, T.E., Stefanello, F.V., Fontana, B.D., Duarte, T., Canzian, J., Rosemberg, D.B., 2018. Nicotine increases fear responses and brain acetylcholinesterase activity in a context-dependent manner in zebrafish. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 170, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.05.004>.
- Zimmermann, F.F., Gaspary, K.V., Siebel, A.M., Bonan, C.D., 2016. Oxytocin reversed MK-801-induced social interaction and aggression deficits in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 311, 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.05.059>.

ARTIGO 2

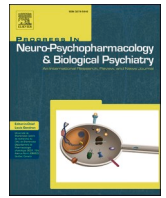
Taurine prevents MK-801-induced shoal dispersion and altered cortisol responses in zebrafish

Francini Franscescon, Thiele P. Souza, Talise E. Müller, Paula Michelotti,
Julia Canzian, Flavia V. Stefanello, Denis B. Rosemberg

Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry (2021)
Dec 20; 111:110399.

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry

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

Taurine prevents MK-801-induced shoal dispersion and altered cortisol responses in zebrafish

Francini Francescon^{a,b,*}, Thiele P. Souza^{a,b}, Talise E. Müller^{a,b}, Paula Michelotti^b,
Julia Canzian^{a,b}, Flavia V. Stefanello^{a,b}, Denis B. Rosemberg^{a,b,c,*}

^a Laboratory of Experimental Neuropsychobiology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Natural and Exact Sciences Center, Federal University of Santa Maria, 1000 Roraima Avenue, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

^b Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, 1000 Roraima Avenue, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

^c The International Zebrafish Neuroscience Research Consortium (ZNRC), 309 Palmer Court, Slidell, LA 70458, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Neuroprotection
Shoaling behavior
Cortisol
Schizophrenia
Zebrafish

ABSTRACT

Schizophrenia is a chronic neuropsychiatric disorder characterized by a shortened lifespan and significant impaired social and vocational functioning. Schizophrenic patients can present hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis dysfunctions and cortisol dysregulation, which play an important role on the etiology onset, exacerbation, and relapsing of symptoms. Based on its intrinsic neuroprotective properties, taurine is considered a promising substance with beneficial role on various brain disorders, including schizophrenia. Here, we evaluated the effects of taurine on shoaling behavior and whole-body cortisol levels in zebrafish treated with dizocilpine (MK-801), which elicits schizophrenia-like phenotypes in animal models. Briefly, zebrafish shoals (4 fish per shoal) were exposed to dechlorinated water or taurine (42, 150, or 400 mg/L) for 60 min. Then, saline (PBS, pH 7.4 or 2.0 mg/kg MK-801) were intraperitoneally injected and zebrafish behavior was recorded 15 min later. In general, MK-801 disrupted shoaling behavior and reduced whole-body cortisol levels in zebrafish. All taurine pretreatments prevented MK-801-induced increase in shoal area, while 400 mg/L taurine prevented the MK-801-induced alterations in neuroendocrine responses. Moreover, all taurine-pretreated groups showed increased geotaxis, supporting a modulatory role in the overall dispersion pattern of the shoal. Collectively, our novel findings show a potential protective effect of taurine on MK-801-induced shoal dispersion and altered neuroendocrine responses, fostering the use of zebrafish models to assess schizophrenia-like phenotypes.

1. Introduction

Schizophrenia is a chronic neuropsychiatric disorder characterized by a shortened lifespan and impaired social and vocational functioning (Tandon et al., 2010). In humans, social behavior is an important biological trace, which is essential for health, reproduction, and survival (Chen and Hong, 2018; Young, 2008). Abnormal sociability is a core symptom of multiple psychiatric disorders (Young, 2008). For example, patients with schizophrenia show poorer social skills (Green et al., 2008; Langdon et al., 2014). In general, schizophrenia is manifested by a heterogeneous combination of symptoms. In addition to the cognitive deficits, patients manifest positive symptoms including hallucinations and delusions (Kahn et al., 2015). Importantly, negative symptoms, such as social withdrawal, blunted affect, anhedonia (the inability to feel

pleasure), avolition (lack of motivation), and alogia (absence or reduction on speech and communication) (Kahn et al., 2015; Leo and Regno, 2000; Pratt et al., 2012) may also occur. The negative symptoms have a key relevance for the illness course, since they strongly affect functional outcomes and the quality of life (Correll and Schooler, 2020; Klaus et al., 2018). When associated with impaired cognition, the negative symptoms represent major sources of disability in schizophrenia (Villalta-Gil et al., 2006). Due to the magnitude of symptomatology associated with schizophrenia (Tandon et al., 2009), patients experience a wide and diverse array of psychosocial difficulties reaching far beyond of disease symptoms (Switaj et al., 2012).

In most of psychiatric disorders, stress is one of the major non-genomic factor involved in the manifestation and exacerbation of symptoms, relapse after a period of remission, and failure to respond the

* Corresponding authors at: Department of Biochemistry and Molecular Biology, Natural and Exact Sciences Center, Federal University of Santa Maria, 1000 Roraima Avenue, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

E-mail addresses: francinifrancescon@gmail.com (F. Francescon), dbrosemberg@gmail.com (D.B. Rosemberg).

<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2021.110399>

Received 11 January 2021; Received in revised form 22 June 2021; Accepted 5 July 2021

Available online 9 July 2021

0278-5846/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

treatment (Moghaddam, 2002). The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis plays an important role in response to stressors and also in regulating somatic and brain functions (Lupien and McEwen, 1997; Stephens and Wand, 2012). Cortisol, the main hormone of the HPA axis, is secreted in response to stress, but also in response to a diurnal rhythm (Schatzberg and Lindley, 2008; Stephens and Wand, 2012). Mounting evidence suggests that alterations in HPA axis function are present in several mental illness (Bradley and Dinan, 2010; Zorn et al., 2017). Although studies report no differences between healthy and schizophrenic individuals regarding cortisol secretion (Breier et al., 1988; Cherian et al., 2019; Rao et al., 1995), other data show the opposite (Belvederi Murri et al., 2012; Walder et al., 2000). Indeed, schizophrenic patients may present HPA axis dysfunction as well as cortisol dysregulation (Bradley and Dinan, 2010; Corcoran et al., 2001; Jansen et al., 1998). In general, a wide number of factors may alter cortisol release in schizophrenic patients (e.g., phase of illness, chronicity, stress vulnerability, and antipsychotic treatments) (Brenner et al., 2009; Carol and Mittal, 2015; Corcoran et al., 2003; Gomes et al., 2019; Gomes and Grace, 2017; Jansen et al., 1998). Thus, the investigation of the HPA activity and the measurement of cortisol levels in a pharmacological model of schizophrenia may help elucidate the basis of neuroendocrine regulation underlying schizophrenia, fostering new therapeutic strategies.

Schizophrenia can be studied in animal models using distinct approaches (Jones et al., 2011). The most common pharmacological strategy to elicit schizophrenia-like behaviors in animal models is based on the inhibition of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors (Bubeníková-Valesová et al., 2008). MK-801 is a non-competitive NMDA receptor antagonist (Nowak et al., 1984), which evokes hyperlocomotion (positive symptom) (Löscher and Hönack, 1992; Martin et al., 1997), social deficits (negative symptom) (Rung et al., 2005), and cognitive impairment (cognitive symptom) (Castellano et al., 1999) in rodents. Although typical antipsychotics (e.g., haloperidol and chlorpromazine) are effective for managing positive symptoms, these drugs present a limited ability for treating the negative symptoms (Leo and Regno, 2000). In the brain, these drugs exert their effect by blocking the access to dopaminergic D₂ receptors (Leo and Regno, 2000). Considering the high incidence of side effects, as well as their low ability to alleviate negative symptoms, the search for alternative/complementary pharmacological treatments is relevant.

Taurine (2-aminoethane-sulfonic acid) is an amino sulfonic acid abundantly found in tissues with high metabolic rate, including brain, retina, skeletal, and heart muscle (Huxtable, 1992; Schaffer et al., 2010). This molecule has shown positive effects in animal models that mimic behavioral phenotypes paralleling those reported in neurological and neuropsychiatric illness (e.g., epileptic seizures, anxiety-related disorders) (Jakaria et al., 2019; Mezzomo et al., 2018; Schaffer and Kim, 2018). Because taurine acts as a neuromodulator in the brain (Mezzomo et al., 2018; Wu and Prentice, 2010) by potentiating the inhibitory neurotransmission (Jia et al., 2008) and controlling Ca²⁺ homeostasis (Chen et al., 2001; Liu et al., 2006; Wu et al., 2005), this molecule emerges as a candidate to counteract glutamate excitotoxicity (Chen et al., 2001; Ye et al., 2013).

As occur in rodents, MK-801 induces social and cognitive impairments (Echevarria et al., 2008; Seibt et al., 2010, 2011), hyperlocomotion, and stereotypic behaviors (Francescon et al., 2020; Seibt et al., 2010; Swain et al., 2004) in zebrafish. Based on the preventive effect of taurine on MK-801-induced hyperlocomotion and memory impairment in this aquatic species (Francescon et al., 2020), we sought to investigate whether taurine plays a beneficial role against MK-801-induced changes in shoaling behavior. Moreover, since the glutamatergic system modulates HPA axis in humans (Mathew et al., 2001) and the hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis of zebrafish is analogous to the HPA axis of mammals (Alsop and Vijayan, 2009), we evaluated a potential modulatory effect of taurine and MK-801 on whole-body cortisol levels.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult zebrafish (*Danio rerio*) were obtained from a local commercial supplier (Hobby Aquários, RS, Brazil). Subjects were animals from the short fin phenotype (4–6 months old, ~50:50 male:female ratio), which are expected to be genetically heterogeneous and to better represent the natural populations, thereby decreasing the effects of arbitrary genetic drift inherited traits (Parra et al., 2009; Speedie and Gerlai, 2008). Animals were maintained in 40 L tanks filled with dechlorinated water at a maximum density of 4 fish per liter under standard conditions (water temperature set at 26 ± 2 °C, and pH 7.0–7.2, conductivity 1500–1600 $\mu\text{S cm}^{-1}$). Fish were acclimated for at least two weeks before the experiments and kept in a room under a controlled light-dark photoperiod cycle (14/10 h, lights on 7:00 am) and fed twice daily with a commercial fish flake food (Alcon BASIC™, Alcon, Brazil). All experiments were run in different days using at least two batches with a randomized treatment order. To ensure data reproducibility, all fish tested were not captured from the same housing tank. All procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (process number 6398060519).

2.2. Drugs

Taurine (2-aminoethanesulfonic acid, NH₂CH₂CH₂SO₃H) and dizocilpine maleate (C₂₀H₁₉NO₄ (+)-MK-801) were acquired from Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA). MK-801 dose and taurine concentrations used were based on previous studies in zebrafish (Francescon et al., 2020; Mezzomo et al., 2019, 2016; Rosemberg et al., 2012).

2.3. Experimental design

Fig. 1 shows the experimental design and the groups tested are shown in Fig. 1A. To assess the effects of taurine and MK-801 on shoaling behavior, four animals (representing each zebrafish shoal tested) were randomly captured from their home tanks and simultaneously exposed to dechlorinated water (control) or 42, 150, or 400 mg/L taurine for 60 min (Fontana et al., 2018; Mezzomo et al., 2019, 2016; Rosemberg et al., 2012, 2010) in 500 mL beakers (Fig. 1B). To ensure the same conditions of behavioral analysis, each shoal was treated separately and fish had physical contact only with their conspecifics of the respective exposure apparatus. Immediately after the exposure, animals were anesthetized in cold water and saline (PBS buffer, pH 7.4) or 2 mg/kg MK-801 were intraperitoneally (i.p.) injected using a BD ultra-fine™ 30 U syringe (needle size 6 mm × 0.25 mm) in a volume of 10 μL (Kinkel et al., 2010). MK-801 solutions were prepared using PBS, pH 7.4 as vehicle. All fish were weighed before the injections and the average weight of animals was 0.375 ± 0.1 g. MK-801 stock solutions were prepared to ensure an adequate volume of injection per fish (10 μL). Shoaling behavior was performed 15 min following the injections and fish were euthanized immediately after the trial to measure whole-body cortisol levels (Fig. 1C).

2.4. Behavioral measurements

2.4.1. Shoaling behavior

To determine the effects of taurine and MK-801 on shoaling response, the behavior of four fish per shoal ($n = 6\text{--}7$ shoals per group) was assessed. The number of fish per shoal was chosen based on previous studies (Canzian et al., 2017; Fontana et al., 2018; Green et al., 2012; Rosa et al., 2020), which show a proper shoaling response (Green et al., 2012) and fully adheres to the reduction criteria of the 3Rs principles of animal experimentation. After the injection, animals (shoals of 4 fish) remained in 500 mL beakers for 15 min (a time period which elicits the main behavioral changes following MK-801 administration) as reported

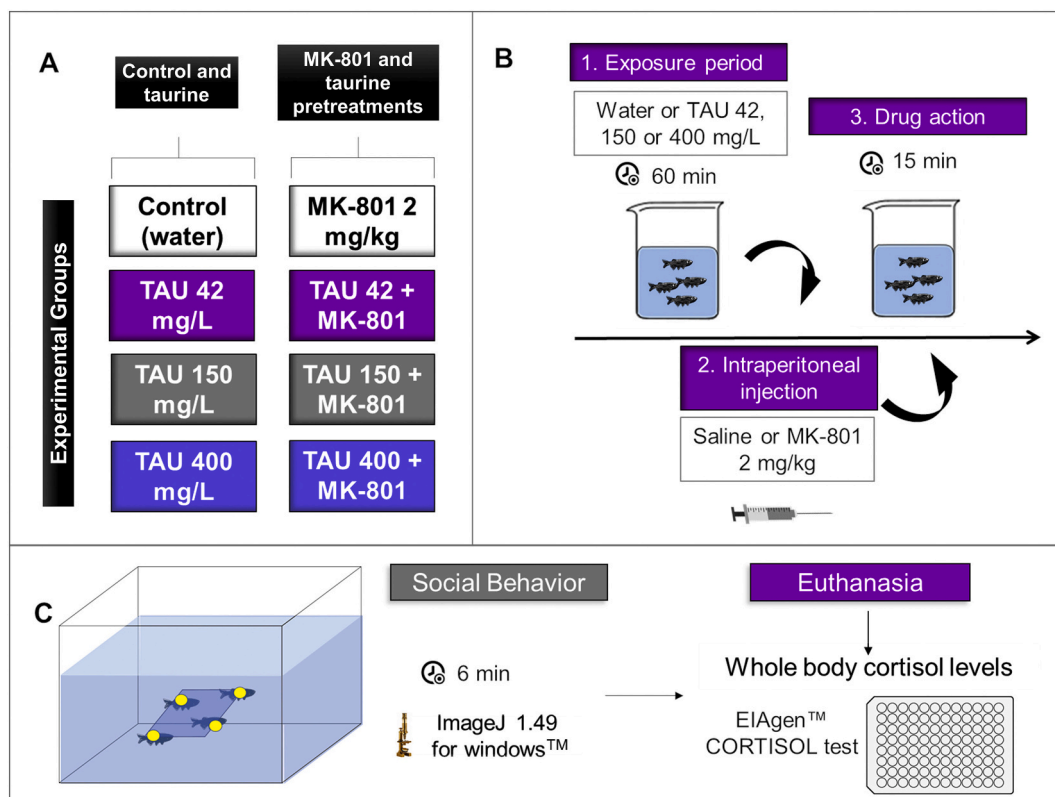


Fig. 1. Experimental design. (A) Experimental groups. (B) Pharmacological treatments (time and exposure protocol). (C) Experiments to measure the shoaling behavior and whole-body cortisol levels.

elsewhere (Francescon et al., 2020; Seibt et al., 2011). Then, shoals were immediately transferred to the test apparatus (25 cm × 15 cm × 11 cm length, height and width) containing dechlorinated water and the shoaling behavior was recorded for 6 min. Two recordings per group were made simultaneously using two apparatuses. Importantly, the experimental groups were assessed in a random order and the water was changed after the respective trials. Videos were obtained using a webcam located in front of the tank and later exported to the Image J 1.49 software for Windows to assess the group response. Zebrafish shoaling behavior was analyzed using screenshots taken every 15 s (24 screens per trial) (Fontana et al., 2018; Green et al., 2012). Screenshots were calibrated proportionally to the tank size to allow the quantification of inter-fish distance, nearest neighbor distance, farthest neighbor distance, and group dispersion (shoal area). To estimate the social interaction index (varying from complete “6” to low “0” cohesion), the proximity between conspecifics at a maximum distance of 3 body lengths or (6 cm) was considered (Canzian et al., 2017). The vertical occupation of fish was measured manually by counting the number of animals in the bottom half of the tank every 15 s (ranging from increased “4” to reduced “0” geotaxis). Two trained observers (inter-rater reliability >0.90) blinded to the experimental condition analyzed the results.

2.5. Cortisol extraction and analysis

Whole-body cortisol was extracted as described elsewhere (Mezzomo et al., 2019; Sink et al., 2008). Immediately after the behavioral tests, animals were euthanized and frozen in liquid nitrogen for 10–30 s to cortisol extraction. Each fish was weighed and minced in 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS pH 7.4). The content was transferred to a glass test tube, which 2.5 mL of laboratory-grade ethyl ether was added. The tube was vortexed by 2 min, then, the portion containing ethyl ether and cortisol was transferred to another tube and completely

evaporated overnight. The cortisol content was resuspended in 100 µL de PBS pH 7.4 used to quantify the whole-body cortisol content (EIAgen™ CORTISOL test, BioChem ImmunoSystems). Both cortisol curve and samples were run in duplicate and the mean values obtained for each shoal were calculated and expressed as ng cortisol/g tissue (Sink et al., 2008). The sample size used here was based on previous reports ($n = 6-7$ per group) (Rosa et al., 2018).

2.6. Statistical analyses

Normality of data and homogeneity of the variances were analyzed by Kolmogorov-Smirnov and Bartlett's tests. Because results were normally distributed and homoscedastic, data were expressed as means ± standard error of the mean (S.E.M.) and analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA), using taurine and MK-801 as factors, followed by Student-Newman-Keuls multiple comparisons test whenever necessary. The number of fish in the bottom area and the number of interactions across time were expressed as median ± interquartile range and area under the curve (AUC) was calculated for each shoal to perform parametric analyses. The level of significance was set at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Taurine prevents MK-801-induced changes in shoal dispersion

Fig. 2A shows the effects of taurine and MK-801 on shoaling behavior. Two-way ANOVA yielded significant effects of taurine × MK-801 interaction ($F_{(3, 42)} = 4.623, p = 0.0070$) and MK-801 ($F_{(1, 42)} = 12.48, p = 0.0010$) for shoal area. *Post hoc* analysis revealed that MK-801 increased shoal area, thereby promoting an overall shoal dispersion pattern, while 42, 150, and 400 mg/L taurine pretreatments prevented this effect. Moreover, MK-801 significantly increased the inter-fish distance ($F_{(1, 42)} = 56.99, p < 0.0001$), the farthest ($F_{(1, 42)} = 59.49, p <$

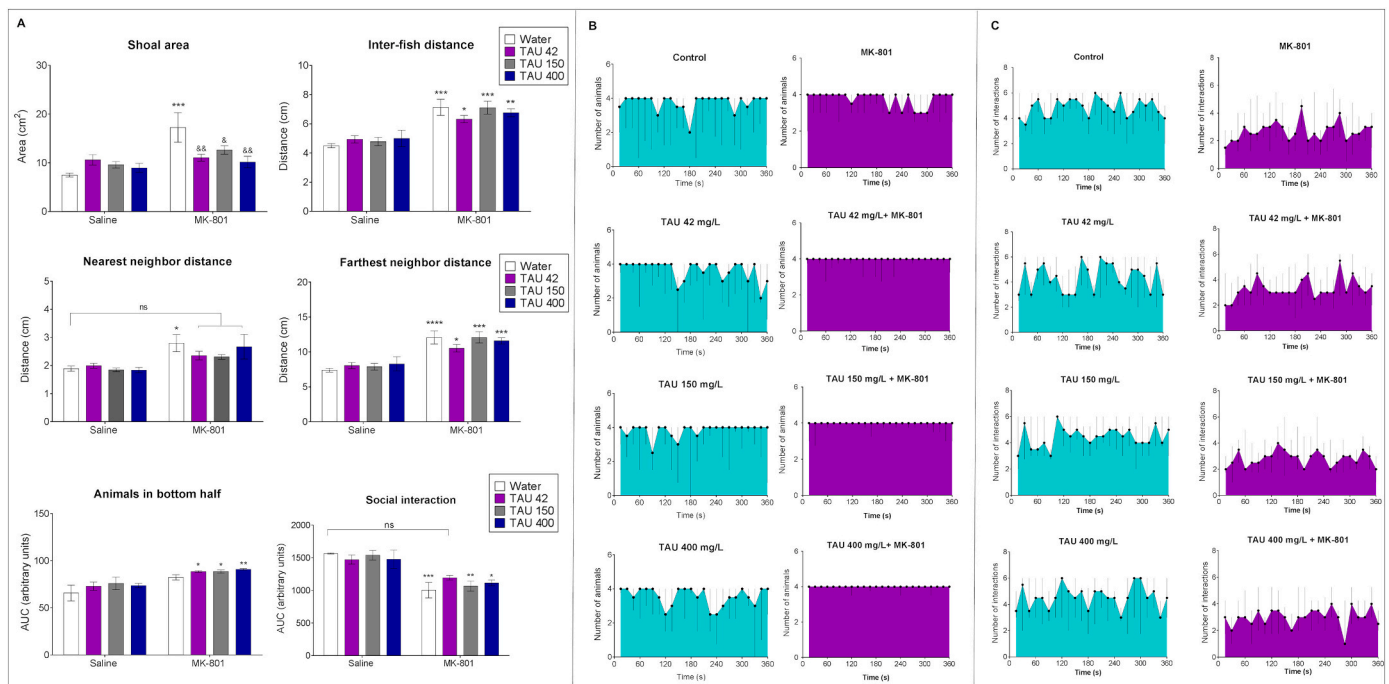


Fig. 2. Neuroprotective effect of taurine against MK-801-induced shoal dispersion in zebrafish. (A) Behavioral endpoints measured. Data were expressed as means \pm S.E.M. and analyzed by two-way ANOVA using MK-801 and taurine as factors, followed by Student Newman Keuls multiple comparison test whenever necessary. (B) Number of fish in the bottom area for each experimental group across the test. Data were represented as median \pm interquartile range. (C) Number interactions for each experimental group across time. Data were represented as median \pm interquartile range. Asterisks denote significant differences compared to control ($^* p < 0.05$) and symbol (&) represent significant differences compared with MK-801 group; (& $p < 0.05$), $n = 6-7$ shoals per group. The absence of statistical difference compared with control was indicated by (ns) symbol.

0.0001) and the nearest neighbor distance ($F_{(1, 42)} = 18.50, p < 0.0001$), while taurine did not significantly change these responses. Regarding the number of animals in the bottom half of the tank, we verified a significant effect of MK-801 ($F_{(1, 42)} = 22.83, p < 0.0001$). Post-hoc analysis yielded that all taurine-pretreated groups showed significant differences compared with control, supporting an influence of taurine and MK-801 in vertical distribution, as observed in temporal analysis of behavior (Fig. 2B). Moreover, AUC analyses of the number of interactions across time (Fig. 2C) revealed significant effects of MK-801 ($F_{(1, 42)} = 46.46, p < 0.0001$), which reduced the social interaction. The same effect was observed for 150 and 400 mg/L taurine-pretreated groups, whereas 42 mg/L taurine pretreatment did not differ from control. Representative images of control, taurine, MK-801 and taurine-pretreated groups are shown in Fig. 3A, while Fig. 3B illustrates schematic representation of the vertical distribution for each experimental group.

3.2. Taurine prevents MK-801-induced decrease in whole-body cortisol levels

Fig. 4 shows the effects of taurine and MK-801 treatments on whole-body cortisol levels. Two-way ANOVA showed significant effects of taurine \times MK-801 interaction ($F_{(3, 42)} = 6.023, p = 0.0017$). MK-801 significantly decreased whole-body cortisol levels ($F_{(1, 42)} = 5.665, p = 0.0219$) and 400 mg/L taurine prevented such effect. Additionally, 42 mg/L taurine pretreatment did not differ from control and MK-801 groups, while taurine alone did not change whole-body cortisol levels.

4. Discussion

To the best of our knowledge, we reported for the first time, the effects of taurine on some behavioral and neuroendocrine changes following MK-801 administration in zebrafish. In general, MK-801

drastically reduced shoal cohesion and whole-body cortisol levels in zebrafish. Here, all taurine pretreatments prevented MK-801-induced shoal dispersion, and 400 mg/L taurine pretreatment abolished the decreased whole-body cortisol levels observed in MK-801 group. Therefore, our findings support a potential role of taurine in preventing MK-801-induced changes in shoal- and stress-related responses.

Abnormal social behavior is a core symptom in some neurodevelopmental disorders, for example, autism spectrum disorder (Frye, 2018), and schizophrenia (Mier and Kirsch, 2015). In animal models, social behavior deficits closely resemble negative symptoms of schizophrenia (Neill et al., 2010; Rung et al., 2005). In line with this, a reduced NMDA receptor function is often associated with poorer social interaction (Jacobs and Tsien, 2017; Zoicas and Kornhuber, 2019). Mounting evidence shows that MK-801 acutely promotes social interaction deficits in rodents (Morales and Spear, 2014; Rung et al., 2005) and zebrafish (Seibt et al., 2011). Doses ranging between 0.05 and 0.3 mg/kg of MK-801 impair social interaction in adult rats (Morales and Spear, 2014; Rung et al., 2005), while zebrafish immersed to a 5 μ M MK-801 solution dissolved into the tank water show reduced shoal response (Seibt et al., 2011; Zimmermann et al., 2016). Our findings revealed that 2.0 mg/kg of MK-801 disrupted shoaling behavior similarly to that observed when fish were exposed to 20 μ M MK-801 (Echevarria et al., 2008; Maaswinkel et al., 2013). The respective reduction of shoal cohesion may be attributed to fish disorientation (Echevarria et al., 2008), as well as to the stimulatory effect on locomotion observed following MK-801 administration reported previously (Francescon et al., 2020).

Taurine is considered a therapeutic molecule with beneficial effects against various brain disorders (Jakaria et al., 2019; Menzie et al., 2014). In humans, the protective properties of taurine have been extensively reported (Firth et al., 2018). For example, taurine supplementation (4 g per day) for 12 weeks significantly attenuates psychotic and depressive symptoms in patients with first-episode psychosis (O'Donnell et al., 2016). Similarly, taurine prevents MK-801-induced

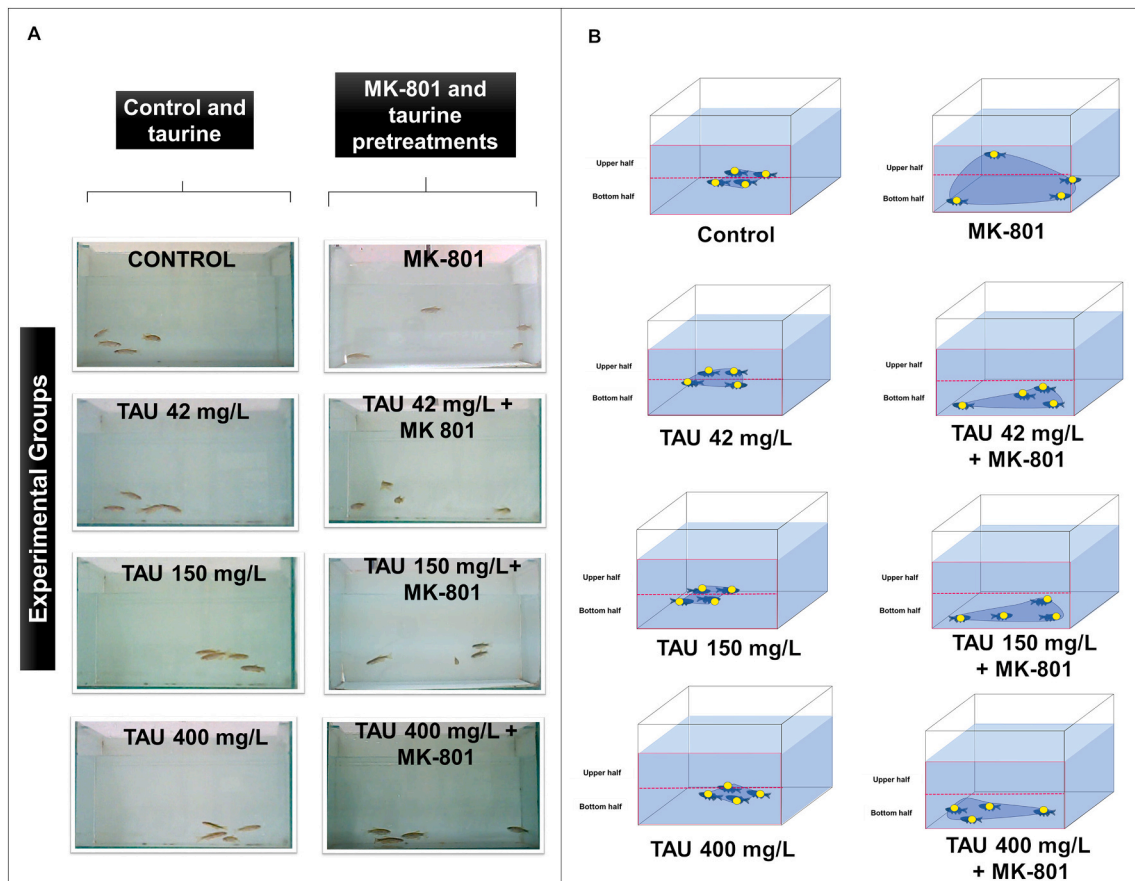


Fig. 3. Overall effects of MK-801 and taurine on shoaling behaviors. (A) Representative images of the shoal cohesion of control, taurine alone, MK-801, and taurine-pretreated groups in the presence of MK-801. (B) Schematic representation of the vertical distribution of each group tested.

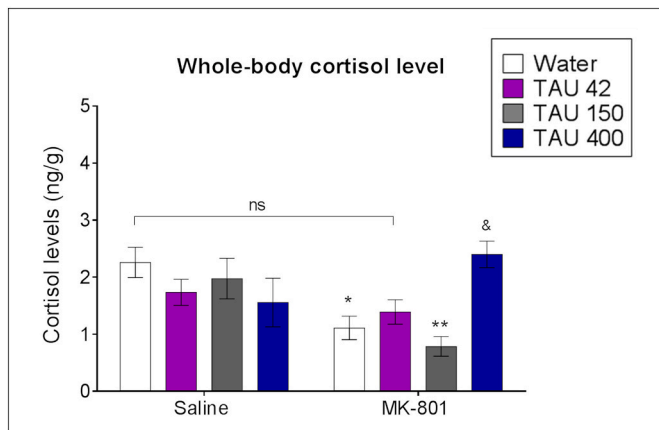


Fig. 4. Effects of taurine and MK-801 on whole-body cortisol levels in zebrafish. Data were expressed as means \pm S.E.M. and analyzed by two-way ANOVA (MK-801 and taurine as factors), followed by Student Newman Keuls multiple comparison test whenever necessary. Asterisks denote significant differences compared to control ($* p < 0.05$) and symbol (&) represent significant differences compared with MK-801 group; ($& p < 0.05$) $n = 6-7$ per group. The absence of statistical difference compared with control was indicated by (ns) symbol.

schizophrenia-like phenotypes, such as hyperlocomotion and memory deficits in zebrafish (Franscescon et al., 2020). Using the social behavior paradigm, although the measurements of inter-fish distance were not affected by taurine, we showed a beneficial role of taurine in preventing

MK-801-induced shoal dispersion, as verified by the shoal area measurements. While the inter-fish distance is a behavioral endpoint that expresses the average distance from individual fish, the shoal area represents an overall pattern of shoal dispersion, since the respective parameter is estimated by the occupancy area of all subjects tested (Canzian et al., 2019, 2017). Data regarding the social interaction revealed that 42 mg/L taurine pretreatment was statistically similar to the control, supporting a mitigating response when compared to the other concentrations tested. Such effect may have occurred due to small reduction in the distances between the nearest and the farthest fish, albeit not statistically significant when compared to MK-801 group. Indeed, since the nearest neighbor distance of taurine-pretreated fish and control did not differ, taurine may potentially attenuate the effects of MK-801 on the respective behavior. Moreover, due to the increased number of animals in the bottom area following taurine pretreatments, the reduced shoal area observed in taurine-pretreated groups may be a consequence of changes in the vertical dispersion rather than a modulatory effect on inter-fish distance. Importantly, both increased shoal cohesion (Speedie and Gerlai, 2008) and geotaxis (Roseberg et al., 2012) are classical protective responses, supporting that taurine positively regulates these behaviors when a group of fish is tested.

The mechanisms associated with taurine actions in the central nervous system (CNS) are relatively complex (Mezzomo et al., 2018; Wu et al., 2005). For example, upon binding to specific taurine receptors (TauR) (Wu et al., 1992), taurine inhibits Ca^{2+} influx via voltage-dependent Ca^{2+} channels and reverse mode Na^{+}/Ca^{2+} exchanger, thereby modulating the Ca^{2+} homeostasis (Chen et al., 2001) and exerting neuroprotection against glutamate-induced neuronal excitotoxicity (Wu et al., 2005). Since taurine also acts as a GABA and glycine agonist (Jia et al., 2008; Zhang and Kim, 2007) and as a NMDA receptor

antagonist (Chan et al., 2014) the potentiation of the inhibitory neurotransmission observed following taurine exposure may partially explain how taurine exerts its beneficial role in the CNS.

It is well documented that several neurotransmitter systems may be altered in schizophrenia (Kristiansen et al., 2009). The most prominent changes involve the glutamatergic and dopaminergic systems (Howes et al., 2015; Hu et al., 2015; Kim et al., 1980). However, serotonergic, GABAergic, cholinergic, histaminergic, and other neurotransmission systems may also be impaired (Kristiansen et al., 2009; Reynolds, 2005). In the pharmacological model tested here, the main effects can be attributed to the antagonism of NMDA receptors. In fact, many factors may alter the stress response in schizophrenic patients, and data regarding cortisol levels may be often controversial (Bradley and Dinan, 2010). Although an association between abnormal social functioning and blunted cortisol response has been postulated in schizophrenic patients (Tas et al., 2018), the heterogeneity of data in relation to the mechanisms of neuroendocrine regulation can be a confounding factor to data translatability.

In line with our findings, individuals treated with glutamatergic antagonists display markedly lower cortisol levels when compared with nontreated group (Coplan et al., 2001). Similarly, the NMDA receptor inhibition decreases stress responses in animal models (Yang et al., 2018, 2016). Although the effects of MK-801 on behavioral and physiological responses to acute and chronic stressors still require future scrutiny, the absence of appropriated HPA axis function can be maladaptive (Heim et al., 2000). Because NMDA receptors play a role in stress responses, the modulatory effect of MK-801 on glutamatergic signaling could result in impaired HPI axis activity. Taurine is known to attenuate stress-related phenotypes, showing antidepressant activity by preventing dysregulation of hormones and neurotransmitters in rats following chronic stress (Wu et al., 2017). In zebrafish, taurine displays antioxidant properties, anxiolytic-like effects (Mezzomo et al., 2016), as well as modulates whole-body cortisol levels following acute stressors (Mezzomo et al., 2019). In general, the effects of taurine on cortisol levels following MK-801 exposure seem to be concentration-dependent. While 42 mg/L taurine pretreatment mitigated the effects of MK-801, 400 mg/L taurine completely prevented MK-801-induced changes in whole body cortisol levels. In the novel tank test, 400 mg/L taurine exerts a protective effect against hyperlocomotion and abolished stereotypic behaviors (e.g., circular swimming in top area) (which represent positive-like symptoms of schizophrenia) observed after MK-801 administration (Franscescon et al., 2020). Interestingly, the same taurine concentration restored the baseline whole-body cortisol levels, as well as prevented the shoal dispersion observed in MK-801 group. Although the mechanisms of taurine in zebrafish have not been fully elucidated yet, the positive effects observed here may probably occur due to a neuromodulatory activity depending on the concentration tested and behavioral phenotype assessed.

Finally, this study has some limitations. It is conceivable that sex differences may modulate some behavioral responses in animal models, including zebrafish (Dos Santos et al., 2021). Although testing a potential effect of sex is beyond the scope of this study, further experiments are necessary to assess whether MK-801- and taurine-mediated effects can be sex-dependent in zebrafish. Furthermore, assessing the preference of a single fish for conspecifics (e.g., social behavior test) may help clarify motivational aspects involved in sociability (Sison and Gerlai, 2011), as well as to verify whether fish disorientation and/or locomotor changes play a role in social responses. However, pharmacological studies show a context-dependent influence on multiple behavioral domains (Tran et al., 2016; Quadros et al., 2016; Ziani et al., 2018) and, therefore, the phenotypes measured in a group of fish do not necessarily correlate with those of an individual subject (Fontana et al., 2018). A possible explanation may be attributed to the several existing chemical and physical interactions in a shoal, which attenuate stress producing less variable behavioral responses (Pagnussat et al., 2013). Notably, the modulatory role of taurine and MK-801 in social behavior and

neuroendocrine responses described here reinforce the growing utility of zebrafish models to investigate the evolutionarily conserved neuro-behavioral basis of human brain disorders.

5. Conclusion

Overall, we report the potential beneficial properties of taurine against MK-801-induced shoal dispersion and neuroendocrine changes in zebrafish. Although the neurochemical mechanisms associated with the protective effects of taurine on MK-801-induced schizophrenia-like phenotypes needs to be fully elucidated, our data support the use of zebrafish models to investigate how social behavior and HPI axis activity are modulated on CNS complex diseases. Moreover, our results reinforce the applicability of zebrafish to investigate neuroprotective substances against glutamatergic excitotoxicity in translational neuroscience research.

Author contributions

1. Conceived and designed the experiments: FF, DBR.
2. Performed the experiments: FF, TPS, PM, JC, FVS.
3. Analyzed the data: FF, TEM, DBR.
4. Contributed reagents/materials/analysis tools DBR.
5. Wrote the paper: FF, DBR.

Ethical statement

- 1) This material has not been published in whole or in part elsewhere;
- 2) The manuscript is not currently being considered for publication in another Journal;
- 3) All authors have been personally and actively involved in substantive work leading to the manuscript and are responsible for its content.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that no competing interests exists.

Acknowledgments

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for their financial support – Finance code 001. F-F and T.E.M. are recipient of CAPES fellowship grants – process number 88882.182160/2018-01 and 88882.182130/2018-01, respectively. D.B.R. is recipient of the CNPq research productivity grant (process number 305051/2018-0) and his work is also supported by PROEX/CAPES fellowship grant (process number 23038.005450/2020-19) and FAPERGS Programa Pesquisador Gaúcho – PQG fellowship grant (process number 19/2551-0001764-2). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- Alsop, D., Vijayan, M., 2009. The zebrafish stress axis: molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event. *Gen. Comp. Endocrinol.* 161, 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.09.011>.
- Belvederi Murri, M., Pariante, C.M., Dazzan, P., Hepgul, N., Papadopoulos, A.S., Zunsain, P., Di Forti, M., Murray, R.M., Mondelli, V., 2012. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and clinical symptoms in first-episode psychosis. *Psychoneuroendocrinology* 37, 629–644. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2011.08.013>.
- Bradley, A.J., Dinan, T.G., 2010. A systematic review of hypothalamic–pituitary–adrenal axis function in schizophrenia: implications for mortality. *J. Psychopharmacol.* 24, 91–118. <https://doi.org/10.1177/1359786810385491>.
- Breier, A., Wolkowitz, O.M., Doran, A.R., Bellar, S., Pickar, D., 1988. Neurobiological effects of lumbar puncture stress in psychiatric patients and healthy volunteers. *Psychiatry Res.* 25, 187–194. [https://doi.org/10.1016/0165-1781\(88\)90050-9](https://doi.org/10.1016/0165-1781(88)90050-9).

- Brenner, K., Liu, A., Laplante, D.P., Lupien, S., Pruessner, J.C., Ciampi, A., Joob, R., King, S., 2009. Cortisol response to a psychosocial stressor in schizophrenia: blunted, delayed, or normal? *Psychoneuroendocrinology* 34, 859–868. <https://doi.org/10.1016/j.psneuen.2009.01.002>.
- Bubeníková-Valesová, V., Horáček, J., Vrajová, M., Höschl, C., 2008. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 1014–1023. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.03.012>.
- Canzian, J., Fontana, B.D., Quadros, V.A., Rosemberg, D.B., 2017. Conspecific alarm substance differently alters group behavior of zebrafish populations: putative involvement of cholinergic and purinergic signaling in anxiety- and fear-like responses. *Behav. Brain Res.* 320, 255–263. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.12.018>.
- Canzian, J., Müller, T.E., Francescon, F., Michelotti, P., Fontana, B.D., Costa, F.V., Rosemberg, D.B., 2019. Modeling psychiatric comorbid symptoms of epileptic seizures in zebrafish. *J. Psychiatr. Res.* 119, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2019.09.007>.
- Carol, E.E., Mittal, V.A., 2015. Resting cortisol level, self-concept, and putative familial environment in adolescents at ultra high-risk for psychotic disorders. *Psychoneuroendocrinology* 57, 26–36. <https://doi.org/10.1016/j.psneuen.2015.03.018>.
- Castellano, C., Cestari, V., Ciamei, A., Pavone, F., 1999. MK-801-induced disruptions of one-trial inhibitory avoidance are potentiated by stress and reversed by naltrexone. *Neurobiol. Learn. Mem.* 72, 215–229. <https://doi.org/10.1006/nlme.1999.3908>.
- Chan, C.Y., Sun, H.S., Shah, S.M., Agovic, M.S., Friedman, E., Banerjee, S.P., 2014. Modes of direct modulation by taurine of the glutamate NMDA receptor in rat cortex. *Eur. J. Pharmacol.* 728, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.01.025>.
- Chen, P., Hong, W., 2018. Neural circuit mechanisms of social behavior. *Neuron* 98, 16–30. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.02.026>.
- Chen, W.Q., Jin, H., Nguyen, M., Carr, J., Lee, Y.J., Hsu, C.C., Faiman, M.D., Schloss, J.V., Wu, J.Y., 2001. Role of taurine in regulation of intracellular calcium level and neuroprotective function in cultured neurons. *J. Neurosci. Res.* 66, 612–619. <https://doi.org/10.1002/jnr.10027>.
- Cherian, K., Schatzberg, A.F., Keller, J., 2019. HPA axis in psychotic major depression and schizophrenia spectrum disorders: cortisol, clinical symptomatology, and cognition. *Schizophr. Res.* 213, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2019.07.003>.
- Coplan, J.D., Mathew, S.J., Smith, E.L.P., Trost, R.C., Scharf, B.A., Martinez, J., Gorman, J.M., Monn, J.A., Schoepp, D.D., Rosenblum, L.A., 2001. Effects of LY354740, a novel glutamatergic metabotropic agonist, on nonhuman primate hypothalamic-pituitary-adrenal axis and noradrenergic function. *CNS Spectr.* 6, 607–617. <https://doi.org/10.1017/S1092852900002157>.
- Corcoran, C., Gallitano, A., Leitman, D., Malaspina, D., 2001. The neurobiology of the stress cascade and its potential relevance for Schizophrenia. *J. Psychiatr. Pract.* 7, 3–14. <https://doi.org/10.1097/00131746-200101000-00002>.
- Corcoran, C., Walker, E., Huot, R., Mittal, V., Tessner, K., Kestler, L., Malaspina, D., 2003. The stress cascade and schizophrenia: etiology and onset. *Schizophr. Bull.* 29, 671–692. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.schbul.a007038>.
- Correll, C.U., Schooler, N.R., 2020. Negative symptoms in schizophrenia: a review and clinical guide for recognition, assessment, and treatment. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 16, 519–534. <https://doi.org/10.2147/NDT.S225643>.
- Dos Santos, B.E., Giacomini, A.C.V.V., Marcon, L., Demin, K.A., Strelakova, T., de Abreu, M.S., Kalueff, A.V., 2021. Sex differences shape zebrafish performance in a battery of anxiety tests and in response to acute scopolamine treatment. *Neurosci. Lett.* 28, 135993. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135993>.
- Echevarria, David J., Hammack, Catherine M., Pratt, Drew W., Hosemann, John D., 2008. A novel behavioral test battery to assess global drug effects using the zebrafish. *Int. J. Comp. Psychol.* 19–34.
- Firth, J., Rosenbaum, S., Ward, P.B., Curtis, J., Teasdale, S.B., Yung, A.R., Sarris, J., 2018. Adjunctive nutrients in first-episode psychosis: a systematic review of efficacy, tolerability and neurobiological mechanisms. *Early Interv. Psychiatry* 12, 774–783. <https://doi.org/10.1111/eip.12544>.
- Fontana, B.D., Stefanello, F.V., Mezzomo, N.J., Müller, T.E., Quadros, V.A., Parker, M.O., Rico, E.P., Rosemberg, D.B., 2018. Taurine modulates acute ethanol-induced social behavioral deficits and fear responses in adult zebrafish. *J. Psychiatr. Res.* 104, 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2018.08.008>.
- Francescon, F., Müller, T.E., Bertoncello, K.T., Rosemberg, D.B., 2020. Neuroprotective role of taurine on MK-801-induced memory impairment and hyperlocomotion in zebrafish. *Neurochem. Int.* 135, 104710. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104710>.
- Frye, R.E., 2018. Social skills deficits in autism Spectrum disorder: potential biological origins and progress in developing therapeutic agents. *CNS Drugs* 32, 713–734. <https://doi.org/10.1007/s40263-018-0556-y>.
- Gomes, F.V., Grace, A.A., 2017. Adolescent stress as a driving factor for schizophrenia development—a Basic science perspective. *Schizophr. Bull.* 43, 486–489. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbx033>.
- Gomes, F.V., Zhu, X., Grace, A.A., 2019. Stress during critical periods of development and risk for schizophrenia. *Schizophr. Res.* 213, 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2019.01.030>.
- Green, J., Collins, C., Kyzar, E.J., Pham, M., Roth, A., Gaikwad, S., Cachat, J., Stewart, A.M., Landsman, S., Grieco, F., Tegelenbosch, R., Noldus, L.P.J.J., Kalueff, A.V., 2012. Automated high-throughput neurophenotyping of zebrafish social behavior. *J. Neurosci. Methods* 210, 266–271. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.07.017>.
- Green, M.F., Penn, D.L., Bentall, R., Carpenter, W.T., Gaebel, W., Gur, R.C., Kring, A.M., Park, S., Silverstein, S.M., Heinssen, R., 2008. Social cognition in schizophrenia: an NIMH workshop on definitions, assessment, and research opportunities. *Schizophr. Bull.* 34, 1211–1220. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbm145>.
- Heim, C., Ehler, U., Hellhammer, D.H., 2000. The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related bodily disorders. *Psychoneuroendocrinology* 25, 1–35. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(99\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(99)00035-9).
- Howes, O., McCutcheon, R., Stone, J., 2015. Glutamate and dopamine in schizophrenia: an update for the 21st century. *J. Psychopharmacol. (Oxford)* 29, 97–115. <https://doi.org/10.1177/0269881114563634>.
- Hu, W., MacDonald, M.L., Elswick, D.E., Sweet, R.A., 2015. The glutamate hypothesis of schizophrenia: evidence from human brain tissue studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1338, 38–57. <https://doi.org/10.1111/nyas.12547>.
- Huxtable, R.J., 1992. Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.* 72, 101–163. <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.1.101>.
- Jacobs, S., Tsien, J.Z., 2017. Adult forebrain NMDA receptors gate social motivation and social memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 138, 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.08.019>.
- Jakaria, M., Azam, S., Haque, M.E., Jo, S.-H., Uddin, M.S., Kim, I.-S., Choi, D.-K., 2019. Taurine and its analogs in neurological disorders: focus on therapeutic potential and molecular mechanisms. *Redox Biol.* 24, 101223. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101223>.
- Jansen, L.M., Gispén-de Wied, C.C., Gademan, P.J., De Jonge, R.C., van der Linden, J.A., Kahn, R.S., 1998. Blunted cortisol response to a psychosocial stressor in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 33, 87–94. [https://doi.org/10.1016/S0920-9964\(98\)00066-8](https://doi.org/10.1016/S0920-9964(98)00066-8).
- Jia, F., Yue, M., Chandra, D., Keramidis, A., Goldstein, P.A., Homanics, G.E., Harrison, N.L., 2008. Taurine is a potent activator of extrasynaptic GABA(a) receptors in the thalamus. *J. Neurosci.* 28, 106–115. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3996-07.2008>.
- Jones, C.A., Watson, D.J.G., Fone, K.C.F., 2011. Animal models of schizophrenia. *Br. J. Pharmacol.* 164, 1162–1194. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01386.x>.
- Kahn, R.S., Sommer, I.E., Murray, R.M., Meyer-Lindenberg, A., Weinberger, D.R., Cannon, T.D., O'Donovan, M., Correll, C.U., Kane, J.M., van Os, J., Insel, T.R., 2015. Schizophrenia. *Nat. Rev. Dis. Primers* 1, 15067. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.67>.
- Kim, J.S., Kornhuber, H.H., Schmid-Burgk, W., Holzmüller, B., 1980. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci. Lett.* 20, 379–382. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(80\)90178-0](https://doi.org/10.1016/0304-3940(80)90178-0).
- Kinkel, M.D., Eames, S.C., Philipson, L.H., Prince, V.E., 2010. Intraperitoneal injection into adult zebrafish. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/2126>.
- Klaus, F., Kaiser, S., Kirschner, M., 2018. Negative symptoms in schizophrenia - an overview. *Ther. Umsch.* 75, 51–56. <https://doi.org/10.1024/0040-5930/a000966>.
- Kristiansen, L.V., Cowell, R.M., Biscaglia, M., McCullumsmith, R.E., Meador-Woodruff, J.H., 2009. Alterations of neurotransmitter receptors in schizophrenia: Evidence from postmortem studies. In: Lajtha, A., Javitt, D., Kantrowitz, J. (Eds.), *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*. Springer US, Boston, MA, pp. 443–492. https://doi.org/10.1007/978-0-387-30410-6_14.
- Langdon, R., Connors, M.H., Connaughton, E., 2014. Social cognition and social judgment in schizophrenia. *Schizophrenia Res.: Cognit.* 1, 171–174. <https://doi.org/10.1016/j.scog.2014.10.001>.
- Leo, R.J., Regno, P.D., 2000. Atypical antipsychotic use in the treatment of psychosis in primary care. *Prim. Care Companion J. Clin. Psychiatry* 2, 194–204. <https://doi.org/10.4088/pcc.v02n0601>.
- Liu, H., Gao, W., Wen, W., Zhang, Y., 2006. Taurine modulates calcium influx through L-type voltage-gated calcium channels in isolated cochlear outer hair cells in Guinea pigs. *Neurosci. Lett.* 399, 23–26. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.01.070>.
- Löscher, W., Hönack, D., 1992. The behavioural effects of MK-801 in rats: involvement of dopaminergic, serotonergic and noradrenergic systems. *Eur. J. Pharmacol.* 215, 199–208. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(92\)90029-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(92)90029-4).
- Lupien, S., McEwen, B., 1997. The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res. Rev.* 24, 1–27. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(97\)00004-0](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(97)00004-0).
- Maaswinkel, H., Zhu, L., Weng, W., 2013. Assessing social engagement in heterogeneous groups of zebrafish: a new paradigm for autism-like behavioral responses. *PLoS One* 8, e75955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075955>.
- Martin, P., Waters, N., Waters, S., Carlsson, A., Carlsson, M.L., 1997. MK-801-induced hyperlocomotion: differential effects of M100907, SDZ PSD 958 and raclopride. *Eur. J. Pharmacol.* 335, 107–116. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)01188-6](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)01188-6).
- Mathew, S.J., Coplan, J.D., Smith, E.L.P., Schoepp, D.D., Rosenblum, L.A., Gorman, J.M., 2001. Glutamate—hypothalamic-pituitary-adrenal axis interactions: implications for mood and anxiety disorders. *CNS Spectr.* 6, 555–564. <https://doi.org/10.1017/S1092852900002091>.
- Menzie, J., Pan, C., Prentice, H., Wu, J.-Y., 2014. Taurine and central nervous system disorders. *Amino Acids* 46, 31–46. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1382-z>.
- Mezzomo, N.J., Silveira, A., Giuliani, G.S., Quadros, V.A., Rosemberg, D.B., 2016. The role of taurine on anxiety-like behaviors in zebrafish: a comparative study using the novel tank and the light-dark tasks. *Neurosci. Lett.* 613, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.12.037>.
- Mezzomo, N.J., Fontana, B.D., Kalueff, A.V., Barcellos, L.J.G., Rosemberg, D.B., 2018. Understanding taurine CNS activity using alternative zebrafish models. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 90, 471–485. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.04.012>.
- Mezzomo, N.J., Fontana, B.D., Müller, T.E., Duarte, T., Quadros, V.A., Canzian, J., Pompermaier, A., Soares, S.M., Koakoski, G., Loro, V.L., Rosemberg, D.B., Barcellos, L.J.G., 2019. Taurine modulates the stress response in zebrafish. *Horm. Behav.* 109, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2019.02.006>.
- Mier, D., Kirsch, P., 2015. Social-cognitive deficits in schizophrenia. In: Wöhr, M., Krach, S. (Eds.), *Social Behavior from Rodents to Humans*, Current Topics in

- Behavioral Neurosciences. Springer International Publishing, Cham, pp. 397–409. https://doi.org/10.1007/7854_2015_427.
- Moghaddam, B., 2002. Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. *Biol. Psychiatry* 51, 775–787. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01362-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01362-2).
- Morales, M., Spear, L.P., 2014. The effects of an acute challenge with the NMDA receptor antagonists, MK-801, PEAQX, and ifenprodil, on social inhibition in adolescent and adult male rats. *Psychopharmacology* 231, 1797–1807. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3278-3>.
- Neill, J.C., Barnes, S., Cook, S., Grayson, B., Idris, N.F., McLean, S.L., Snigdha, S., Rajagopal, L., Harte, M.K., 2010. Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism. *Pharmacol. Ther.* 128, 419–432. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.07.004>.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., Prochiantz, A., 1984. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307, 462–465. <https://doi.org/10.1038/307462a0>.
- O'Donnell, C.P., Allott, K.A., Murphy, B.P., Yuen, H.P., Proffitt, T.-M., Papas, A., Moral, J., Pham, T., O'Regan, M.K., Phassouliotis, C., Simpson, R., McGorry, P.D., 2016. Adjunctive taurine in first-episode psychosis: a phase 2, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *J. Clin. Psychiatry* 77, e1610–e1617. <https://doi.org/10.4088/JCP.15m10185>.
- Pagnussat, N., Piato, A.L., Schaefer, I.C., Blank, M., Tamborski, A.R., Guerim, L.D., Bonan, C.D., Vianna, M.R., Lara, D.R., 2013. One for all and all for one: the importance of shoaling on behavioral and stress responses in zebrafish. *Zebrafish* 10 (3), 338–342. <https://doi.org/10.1089/zeb.2013.0867>.
- Parra, K.V., Adrian, J.C., Gerlai, R., 2009. The synthetic substance hypoxanthine 3-N-oxide elicits alarm reactions in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 205, 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.037>.
- Pratt, J., Winchester, C., Dawson, N., Morris, B., 2012. Advancing schizophrenia drug discovery: optimizing rodent models to bridge the translational gap. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 560–579. <https://doi.org/10.1038/nrd3649>.
- Quadros, V.A., Silveira, A., Giuliani, G.S., Didonet, F., Silveira, A.S., Nunes, M.E., Silva, T.O., Loro, V.L., Rosemberg, D.B., 2016. Strain- and context-dependent behavioural responses of acute alarm substance exposure in zebrafish. *Behav. Process.* 122, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2015.10.014>.
- Rao, M.L., Strebel, B., Halaris, A., Gross, G., Bräunig, P., Huber, G., Marler, M., 1995. Circadian rhythm of vital signs, norepinephrine, epinephrine, thyroid hormones, and cortisol in schizophrenia. *Psychiatry Res.* 57, 21–39. [https://doi.org/10.1016/0165-1781\(95\)02525-2](https://doi.org/10.1016/0165-1781(95)02525-2).
- Reynolds, G.P., 2005. The neurochemistry of schizophrenia. *Psychiatry, Schizophrenia* 1 (4), 21–25. <https://doi.org/10.1383/psyt.2005.4.10.21>.
- Rosa, L.V., Ardais, A.P., Costa, F.V., Fontana, B.D., Quadros, V.A., Porciúncula, L.O., Rosemberg, D.B., 2018. Different effects of caffeine on behavioral neurophenotypes of two zebrafish populations. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 165, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.12.002>.
- Rosa, L.V., Costa, F.V., Canzian, J., Borba, J.V., Quadros, V.A., Rosemberg, D.B., 2020. Three- and bi-dimensional analyses of the shoaling behavior in zebrafish: influence of modulators of anxiety-like responses. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 102, 109957. <https://doi.org/10.1016/j.pnpb.2020.109957>.
- Rosemberg, D.B., da Rocha, R.F., Rico, E.P., Zanotto-Filho, A., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Moreira, J.C.F., Klamt, P., Souza, D.O., 2010. Taurine prevents enhancement of acetylcholinesterase activity induced by acute ethanol exposure and decreases the level of markers of oxidative stress in zebrafish brain. *Neuroscience* 171, 683–692. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.09.030>.
- Rosemberg, D.B., Braga, M.M., Rico, E.P., Loss, C.M., Córdova, S.D., Mussulini, B.H.M., Blaser, R.E., Leite, C.E., Campos, M.M., Dias, R.D., Calcagnotto, M.E., de Oliveira, D. L., Souza, D.O., 2012. Behavioral effects of taurine pretreatment in zebrafish acutely exposed to ethanol. *Neuropharmacology* 63, 613–623. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.05.009>.
- Rung, J.P., Carlsson, A., Rydén Markinhuhta, K., Carlsson, M.L., 2005. (+)-MK-801 induced social withdrawal in rats; a model for negative symptoms of schizophrenia. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29, 827–832. <https://doi.org/10.1016/j.pnpb.2005.03.004>.
- Schaffer, S., Kim, H.W., 2018. Effects and mechanisms of taurine as a therapeutic agent. *Biomol. Ther. (Seoul)* 26, 225–241. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2017.251>.
- Schaffer, S.W., Jong, C.J., Ramila, K.C., Azuma, J., 2010. Physiological roles of taurine in heart and muscle. *J. Biomed. Sci.* 17 (Suppl. 1), S2. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-S1-S2>.
- Schatzberg, A.F., Lindley, S., 2008. Glucocorticoid antagonists in neuropsychotic disorders. *Eur. J. Pharmacol.* 583, 358–364. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.01.001>.
- Seibt, K.J., Oliveira, R. da L., Zimmermann, F.F., Capiotti, K.M., Bogo, M.R., Ghisleni, G., Bonan, C.D., 2010. Antipsychotic drugs prevent the motor hyperactivity induced by psychotomimetic MK-801 in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 214, 417–422. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.06.014>.
- Seibt, K.J., Piato, A.L., da Luz Oliveira, R., Capiotti, K.M., Vianna, M.R., Bonan, C.D., 2011. Antipsychotic drugs reverse MK-801-induced cognitive and social interaction deficits in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 224, 135–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.05.034>.
- 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>.
- Sison, M., Gerlai, R., 2011. Behavioral performance altering effects of MK-801 in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 220 (2), 331–337. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.02.019>.
- Speedie, N., Gerlai, R., 2008. Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* 188, 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.10.031>.
- Stephens, M.A.C., Wand, G., 2012. Stress and the HPA axis: role of glucocorticoids in alcohol dependence. *Alcohol. Res.* 34, 468–483.
- Swain, H.A., Sigstad, C., Scalzo, F.M., 2004. Effects of dizocilpine (MK-801) on circling behavior, swimming activity, and place preference in zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicol. Teratol.* 26, 725–729. <https://doi.org/10.1016/j.nt.2004.06.009>.
- Świtaj, P., Anczewska, M., Chrostek, A., Sabariego, C., Cieza, A., Bickenbach, J., Chatterji, S., 2012. Disability and schizophrenia: a systematic review of experienced psychosocial difficulties. *BMC Psychiatry* 12, 193. <https://doi.org/10.1186/1471-244X-12-193>.
- Tandon, R., Nasrallah, H.A., Keshavan, M.S., 2009. Schizophrenia, “just the facts” 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophr. Res.* 110, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2009.03.005>.
- Tandon, R., Nasrallah, H.A., Keshavan, M.S., 2010. Schizophrenia, “just the facts” 5. Treatment and prevention. Past, present, and future. *Schizophr. Res.* 122, 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2010.05.025>.
- Tas, C., Brown, E.C., Eskikurt, G., Irmak, S., Aydın, O., Esen-Danaci, A., Brüne, M., 2018. Cortisol response to stress in schizophrenia: associations with oxytocin, social support and social functioning. *Psychiatry Res.* 270, 1047–1052. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2018.05.011>.
- Tran, S., Muraleetharan, A., Fulcher, N., Chatterjee, D., Gerlai, R., 2016. MK-801 increases locomotor activity in a context-dependent manner in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 296, 26–29. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.08.029>.
- Villalta-Gil, V., Vilaplana, M., Ochoa, S., Haro, J.M., Dolz, M., Usall, J., Cervilla, J., NEDENA Group, 2006. Neurocognitive performance and negative symptoms: are they equal in explaining disability in schizophrenia outpatients? *Schizophr. Res.* 87, 246–253. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2006.06.013>.
- Walder, D.J., Walker, E.F., Lewine, R.J., 2000. Cognitive functioning, cortisol release, and symptom severity in patients with schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 48, 1121–1132. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(00\)01052-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)01052-0).
- Wu, G.-F., Ren, S., Tang, R.-Y., Xu, C., Zhou, J.-Q., Lin, S.-M., Feng, Y., Yang, Q.-H., Hu, J.-M., Yang, J.-C., 2017. Antidepressant effect of taurine in chronic unpredictable mild stress-induced depressive rats. *Sci. Rep.* 7, 4989. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05051-3>.
- Wu, H., Jin, Y., Wei, J., Jin, H., Sha, D., Wu, J.-Y., 2005. Mode of action of taurine as a neuroprotector. *Brain Res.* 1038, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.01.058>.
- Wu, J.-Y., Prentice, H., 2010. Role of taurine in the central nervous system. *J. Biomed. Sci.* 17 (Suppl. 1), S1. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-S1-S1>.
- Wu, J.-Y., Tang, X.W., Tsai, W.H., 1992. Taurine receptor: kinetic analysis and pharmacological studies. *Adv. Exp. Med. Biol.* 315, 263–268. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3436-5_31.
- Yang, B., Ren, Q., Ma, M., Chen, Q.-X., Hashimoto, K., 2016. Antidepressant effects of (+)-MK-801 and (–)-MK-801 in the social defeat stress model. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 19. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyx080>.
- Yang, B., Qin, J., Nie, Y., Chen, J., 2018. Sustained antidepressant action of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 in a chronic unpredictable mild stress model. *Exp. Ther. Med.* <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6876>.
- Ye, H.-B., Shi, H.-B., Yin, S.-K., 2013. Mechanisms underlying taurine protection against glutamate-induced neurotoxicity. *Can. J. Neurol. Sci.* 40, 628–634.
- Young, S.N., 2008. The neurobiology of human social behaviour: an important but neglected topic. *J. Psychiatry Neurosci.* 33, 391–392.
- Zhang, C.G., Kim, S.-J., 2007. Taurine induces anti-anxiety by activating strychnine-sensitive glycine receptor in vivo. *Ann. Nutr. Metab.* 51, 379–386. <https://doi.org/10.1159/000107687>.
- Ziani, P.R., Müller, T.E., Stefanello, F.V., Fontana, B.D., Duarte, T., Canzian, J., Rosemberg, D.B., 2018. Nicotine increases fear responses and brain acetylcholinesterase activity in a context-dependent manner in zebrafish. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 170, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.05.004>.
- Zimmermann, F.F., Gaspary, K.V., Siebel, A.M., Bonan, C.D., 2016. Oxytocin reversed MK-801-induced social interaction and aggression deficits in zebrafish. *Behav. Brain Res.* 311, 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.05.059>.
- Zoicas, I., Kornhuber, J., 2019. The role of the N-methyl-D-aspartate receptors in social behavior in rodents. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20225599>.
- Zorn, J.V., Schür, R.R., Boks, M.P., Kahn, R.S., Joëls, M., Vinkers, C.H., 2017. Cortisol stress reactivity across psychiatric disorders: a systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 77, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.psychneuro.2016.11.036>.

7. DISCUSSÃO

A esquizofrenia é uma doença neuropsiquiátrica crônica, composta por um conjunto heterogêneo de sintomas, os quais abrangem distintos domínios comportamentais, psíquicos e cognitivos (KAHN et al., 2015). Desde a descoberta dos primeiros antipsicóticos, em meados de 1950 (BAN, 2007), a terapia farmacológica da esquizofrenia não avançou de forma significativa. Nesse aspecto, novos medicamentos os quais baseiam-se no mesmo mecanismo de ação dos antipsicóticos já existentes, principalmente no bloqueio dos receptores dopaminérgicos D₂, têm sido desenvolvidos, deixando-se de pesquisar ações e intervenções diferenciadas que realmente possam impactar o tratamento dessa doença. Desse modo, pesquisas que se propõe a investigar novos mecanismos de ação e estratégias de intervenção farmacológica tonam-se promissoras. No presente estudo, mostramos pela primeira vez as propriedades protetivas da taurina frente a alterações comportamentais desencadeadas por MK-801, validando, desse modo, nossa hipótese inicial de que a taurina exerce neuroproteção antagonizando fenótipos relacionados à esquizofrenia em peixes-zebra.

O uso de modelos animais é uma ferramenta essencial para investigar os efeitos de substâncias com potencial terapêutico em doenças neuropsiquiátricas. Nesse aspecto, o peixe-zebra, é de grande valor, pois é possível modelar fenótipos de doenças complexas como a esquizofrenia, e realizar triagem de novos fármacos (DEMIN et al., 2019; FONTANA et al., 2018b; KOKEL e PETERSON, 2008). Para estudar os efeitos da taurina em nosso modelo, primeiramente buscamos mimetizar a hiperlocomoção e o déficit cognitivo induzidos por MK-801 em peixe-zebra. Em geral, tais fenótipos emergem após a administração de antagonistas dos receptores NMDA, sendo que a hiperlocomoção e o déficit cognitivo, refletem os sintomas positivos e o déficit de memória, respectivamente, observados em seres humanos acometidos pela esquizofrenia. Partindo desse pressuposto, testamos o efeito de diferentes doses 0,1, 0,3, 0,5 1 e 2 mg/kg de MK-801 no comportamento de peixe-zebra. Inicialmente, observamos uma redução na retenção de memória de maneira dependente da dose. Nossos achados demonstraram que a dose 2 mg/kg diminui significativamente a retenção da memória na esQUIVA inibitória, bem como aumenta a distância percorrida e o tempo de permanência na área do topo no teste do tanque novo, mostrando replicar os efeitos comportamentais (*e.g.*, hiperlocomoção e déficit cognitivo) desencadeados por MK-801 em estudos prévios, porém utilizando uma via de administração de droga distinta (através de injeção *i.p.*) (BLANK et al., 2009; MENEZES et al., 2015; SEIBT et al., 2010). Evidências têm mostrado o envolvimento da via

glutamatérgica em processos de aprendizagem e memória, plasticidade sináptica e LTP (GASBARRI e POMPILI, 2014; RIEDEL, PLATT e MICHEAU, 2003). Em geral, é demonstrado que o MK-801 pode causar déficit cognitivo tanto em roedores (CASTELLANO et al., 1999), quanto em peixes-zebra (BLANK et al., 2009), reforçando o papel evolutivamente conservado da via glutamatérgica em processos cognitivos. Por outro lado, quando se avalia os efeitos do MK-801 na locomoção do peixe-zebra, discrepâncias emergem na literatura. Por exemplo, alguns estudos mostram que a exposição ao MK-801 2 e 5 μM por 60 min diminui a atividade locomotora (BENVENUTTI et al., 2021; SWAIN, SIGSTAD e SCALZO, 2004), ou não altera locomoção (SISON e GERLAI, 2011), enquanto em outros observa-se que o MK-801 5 e 20 μM por 15, 30 e 60 min induz hiperlocomoção (MENEZES et al., 2015; SEIBT et al., 2010). Apesar das discrepâncias, anteriormente demonstrou-se que a pré-exposição ao MK-801 seguida da inserção em ambiente novo, é acompanhada pelo aumento da locomoção, sugerindo que alterações locomotoras podem ocorrer dependendo do contexto em que o animal é inserido (TRAN et al., 2016). Portanto, disparidades em relação às alterações locomotoras podem emergir devido a linhagens distintas de peixes empregadas e com base nas variações dos protocolos. Assim, deve-se analisar com cuidado a interpretação dos resultados e mais estudos são requeridos para esclarecer o papel do MK-801 na locomoção de peixes-zebra. Em consonância com estudos prévios, nossos dados mostram que peixes-zebra tratados com MK-801 aumentam o tempo de permanência da área do topo, o que pode refletir uma redução no comportamento de ansiedade ou alterações locomotoras (BENVENUTTI et al., 2021; SEIBT et al., 2010). Em suma, os principais achados desta tese, incluem a atividade protetora da taurina frente as alterações comportamentais induzidas pelo MK-801 2 mg/kg em peixes-zebra, evidenciando também os efeitos do MK-801 em uma via alternativa de administração como a injeção (*i.p.*). Em geral, no primeiro artigo, foi demonstrado que o tratamento com taurina 42 e 150 mg/L previne o déficit cognitivo induzido pelo MK-801, e que a taurina 400 mg/L apenas atenua os efeitos do MK-801 na memória de peixes-zebra. Todavia, quando a hiperlocomoção e o tempo de permanência na área do topo foram avaliados, apenas o pré-tratamento com a taurina 400 mg/L preveniu essas alterações induzidas pelo MK-801, enfatizando assim, que as propriedades protetoras da taurina podem ser dependentes de concentração e do fenótipo que está sendo avaliado.

No segundo artigo desta tese, continuamos analisando os efeitos da taurina frente às alterações comportamentais induzidas pelo MK-801 na dose de 2 mg/kg. Desta vez, avaliamos os efeitos do MK-801 e taurina no comportamento de cardume de peixes-zebra. É importante ressaltar que o peixe-zebra é uma espécie extremamente sociável, e esse caráter tem sido

explorado em diversos estudos, no sentido de investigar como a sociabilidade ou falta dela pode impactar a vida e o bem estar dos indivíduos (FONTANA et al., 2021). Sabe-se que um dos principais sintomas que ocorrem na esquizofrenia é a retirada social, sendo considerado um sintoma negativo. Em modelos animais, o déficit social relembra os sintomas negativos que ocorre na clínica da esquizofrenia (NEILL et al., 2010; RUNG et al., 2005). Considerando tais fatos, decidimos investigar se a administração do MK-801 (2 mg/kg) prejudicaria o comportamento de cardume em peixes-zebra. Nossos resultados demonstraram que os animais tratados com MK-801 tiveram sua sociabilidade prejudicada, manifestando um aumento significativo na área de cardume e na distância entre os peixes. Além do mais, observamos um aumento significativo na distância do vizinho mais próximo e distância do vizinho mais distante, e uma redução significativa na interação social. As alterações nos parâmetros referidos caracterizam um déficit social emergente e estão em acordo com estudos prévios os quais também demonstraram que o MK-801 prejudica a sociabilidade em cardumes de peixes-zebra (ECHEVARRIA, et al., 2008; MAASWINKEL, ZHU e WENG, 2013). Ainda, com relação à sociabilidade, a exposição ao MK-801 mostrou reduzir a preferência por coespecíficos no teste de preferência social (BENVENUTTI et al., 2021; SEIBT et al., 2011; SISON e GERLAI, 2011). Em geral, a administração dos antipsicóticos sulpirida e olanzapina reestabeleceu a preferência por coespecíficos revertendo os efeitos do MK-801 (SEIBT et al., 2011). De maneira similar, os dados do segundo artigo demonstram que, apesar da taurina não exercer efeito protetivo nas medidas de distância entre os peixes, ela previne o aumento da dispersão do cardume induzido por MK-801 (pela análise quantitativa da área do cardume). É importante destacar que enquanto a distância entre os peixes é um parâmetro que expressa a distância média entre os peixes de maneira individual, a área do cardume representa um padrão geral de dispersão do grupo, desde que essa é estimada pela ocupação de todos os sujeitos testados (CANZIAN et al., 2017; 2019). No caso da distância entre os peixes, um único animal que estiver mais afastado do cardume, determina 50% dos componentes da medida da distância entre os peixes (pois ele estabelece três de um total de seis elementos da medida desse parâmetro) (MAASWINKEL, ZHU e WENG, 2013). Os dados referentes à interação social mostraram que o pré-tratamento com taurina 42 mg/L foi similar ao controle, suportando uma resposta de atenuação comparada a outras concentrações testadas. Sugere-se que esse efeito possa ter ocorrido devido as menores distâncias entre o vizinho mais próximo e o vizinho mais distante, apesar de não significativas quando comparadas ao MK-801. Desse modo, a taurina poderia mitigar os efeitos do MK-801 nos respectivos parâmetros. Além disso, o aumento no número de animais na área do fundo observado no pré-tratamento com taurina pode ser uma

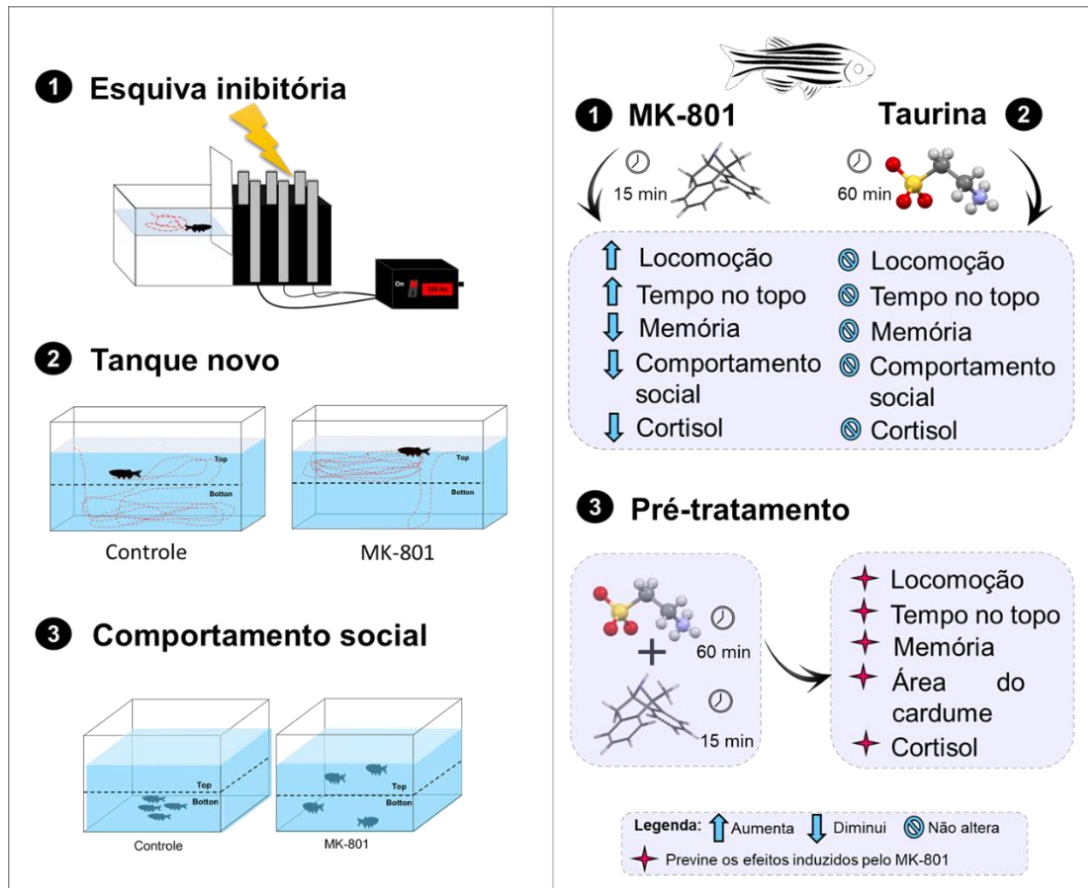
consequência de alterações na dispersão vertical em vez de resultar da modulação na distância entre os peixes. Em conclusão, sabe-se que o aumento na coesão do cardume (SPEEDIE e GERLAI, 2008) e a geotaxia (ROSEMBERG et al., 2012) são respostas defensivas observadas em grupos, sugerindo o papel modulador da taurina nesses parâmetros comportamentais envolvendo cardumes de peixes-zebra.

Por desempenhar ação pleiotrópica no SNC, a taurina tem sido considerada uma molécula potencialmente terapêutica para tratar doenças neurológicas e neuropsiquiátricas (JAKARIA et al., 2019; MEZZOMO et al., 2018; SCHAFFER e KIM, 2018). Apesar dos mecanismos de ação da taurina serem relativamente complexos, em geral, essa molécula pode exercer seus efeitos através de receptores específicos de taurina (TauR) (WU, TANG e TSAI, 1992), regulando o influxo de Ca^{2+} (CHEN et al., 2001; YE, SHI e YIN, 2013), e, desse modo, antagonizando a excitotoxicidade do glutamato (WU et al., 2005). Como neuromoduladora, a taurina atua através de diversos mecanismos, inibindo as respostas mediadas pelos receptores NMDA (CHAN et al., 2014). Em relação a nossos dados, hipotetizamos que a taurina reduz os efeitos do MK-801 não apenas via interação direta com os receptores NMDA, mas muito se deve ao seu papel neuromodulador no cérebro. Essa molécula pode estimular a sinalização inibitória atuando como agonista dos receptores GABA_A e glicina (JIA et al., 2008), promovendo o influxo de cloreto (Cl^-) (OKAMOTO, KIMURA e SAKAI, 1983b, 1983a). A taurina também pode desempenhar diversos mecanismos para reduzir o grau de dano em membranas celulares, sendo relatado que ela é capaz de prevenir a diminuição da atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase no fígado, além de reduzir a formação de peróxido lipídico e acúmulo de lactato no cérebro de ratos em modelo de hipóxia (MANKOVSKAYA et al., 2000). Esse fato é particularmente importante pois sabe-se que alterações no metabolismo oxidativo (GAMA et al., 2008) e do ATP (adenosina trifosfato) (VOLZ et al., 2000) podem estar presentes no cérebro de pacientes com esquizofrenia.

O papel chave do estresse agudo em transtornos psiquiátricos é bem reconhecido, e seu potencial etiológico para desencadear transtorno psicótico agudo é bem descrito na definição da síndrome no guia de classificação de transtornos mentais e comportamentais (ICD-10) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992). Sabe-se que diversos fatores podem alterar a resposta de estresse em pacientes com esquizofrenia (*e.g.*, cronicidade da doença, tratamento com antipsicóticos, tipo de sintomas proeminentes, etc.) (BRADLEY e DINAN, 2010; JANSEN et al., 1998). Desse modo, no segundo artigo, avaliamos os níveis de cortisol do corpo inteiro dos animais do cardume tratados com taurina e MK-801. De maneira geral, observou-se que a administração do MK-801 reduz significativamente os níveis de cortisol, e que o

tratamento com taurina 400 mg/L previne esse efeito. Similarmente, estudos retratam que indivíduos tratados com antagonistas glutamatérgicos exibem níveis mais baixos de cortisol quando comparados a seus controles (COPLAN et al., 2001) e que a inibição farmacológica dos receptores NMDA precede a diminuição da resposta de estresse (YANG et al., 2018). Em peixes-zebra, a taurina exerce atividade ansiolítica e modula os níveis de cortisol do corpo inteiro após estresse agudo (MEZZOMO et al., 2016, 2019). No presente estudo, observamos que os efeitos da taurina nos níveis de cortisol parecem ser dependentes de concentração. Enquanto que o tratamento com taurina 42mg/L atenua os efeitos do MK-801 nos níveis de cortisol, a taurina 400mg/L previne completamente a redução no cortisol desencadeada pelo MK-801. Os principais achados e os testes comportamentais realizados nesse estudo estão representados de maneira simplificada na **Figura 4**. Juntos, esses dados, complementam os resultados obtidos no primeiro artigo, os quais demonstram que o tratamento com a taurina 400mg/L inibe a hiperlocomoção e alteração na exploração vertical evocadas pelo MK-801 em peixes-zebra. Além do mais, nossos resultados enfatizam a importância potencial da taurina a qual tem como alvo principal a via glutamatérgica, exercendo, portanto, um mecanismo de ação diferente dos antipsicóticos convencionais (que atuam principalmente como antagonistas dos receptores D₂ de dopamina). Por fim, apesar dos mecanismos neurobiológicos da taurina em peixe-zebra ainda não estarem totalmente elucidados, seus efeitos benéficos podem ter ocorrido provavelmente devido ao seu papel neuromodulador dependendo da concentração e fenótipo avaliado.

Figura 4. Esquema representativo dos testes comportamentais realizados e dos principais achados desta tese.



Fonte: do autor.

8. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nessa tese, demonstraram pela primeira vez o efeito neuroprotetor da taurina frente aos fenótipos comportamentais de esquizofrenia induzidos por MK-801 em peixe-zebra. Em geral, o pré-tratamento com taurina foi capaz de prevenir alterações em parâmetros locomotores, exploratórios e déficit cognitivo induzido pelo MK-801. Do mesmo modo, a taurina preveniu alterações na dispersão da área do cardume e a redução dos níveis de cortisol do corpo inteiro desencadeados pelo MK-801. De maneira geral, nossos dados reforçam o caráter neuroprotetor da taurina, a qual é uma molécula promissora que está sendo cada vez mais estudada. Paralelamente, nossos achados indicam que o peixe-zebra pode ser utilizado para estudar como o comportamento social e eixo HPI são modulados em doenças complexas do SNC. Embora mais estudos sejam necessários para esclarecer os mecanismos exatos envolvidos nas repostas obtidas neste estudo, nossos resultados suportam a crescente utilidade do peixe-zebra para investigar substâncias neuroprotetoras contra excitotoxicidade glutamatérgica em pesquisas translacionais.

9. PERSPECTIVAS

No sentido de melhor caracterizar o efeito neuroprotetor da taurina em alterações neurocomportamentais induzidas por MK-801 as perspectivas deste estudo são:

- Analisar os efeitos da administração aguda e repetida do MK-801 na atividade da enzima Na^+K^+ -ATP-ase e enzimas do metabolismo antioxidante (SOD, CAT, GPx) em encéfalo de peixes-zebra.
- Quantificar os níveis de glutamato e catecolaminas (dopamina e serotonina) após a administração de MK-801, através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).
- Elucidar os mecanismos de geração de radicais livres induzidos pelo MK-801 bem como o possível efeito protetor da taurina, através de respirometria de alta resolução realizada no tecido cerebral de peixes-zebra.
- Analisar os efeitos do estresse agudo e crônico frente ao déficit social e cognitivo induzido pelo MK-801 em peixes-zebra.
- Investigar os efeitos do estresse agudo e crônico e do MK-801 na modulação de parâmetros antioxidantes e inflamatórios no tecido cerebral de peixe-zebra.

REFERÊNCIAS

- ADOLPHS, R. Cognitive neuroscience of human social behaviour. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 3, p. 165–178, 2003.
- AGHAJANIAN, G. Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate mechanisms. **Brain Research Reviews**, v. 31, n. 2–3, p. 302–312, 2000.
- ALSOP, D.; VIJAYAN, M. M. Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 3, p. R711-719, 2008.
- ALSOP, D.; VIJAYAN, M. The zebrafish stress axis: molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event. **General and Comparative Endocrinology**, v. 161, n. 1, p. 62–66, 2009.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION; AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (org.). **Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5**. 5th eded. Washington, D.C: American Psychiatric Association, 2013.
- ANTONELLA GASBARRI; ASSUNTA POMPILI. **Involvement of Glutamate in Learning and Memory**: Elsevier, 2014.
- ARUNACHALAM, M. et al. Natural history of zebrafish (*Danio rerio*) in India. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2013.
- AUQUIER, P. et al. Mortality in schizophrenia. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, v. 15, n. 12, p. 873–879, 2006.
- AUTHORITY (EFSA), E. F. S. The use of taurine and D-glucurono-gamma-lactone as constituents of the so-called “energy” drinks. **EFSA Journal**, v. 7, n. 2, p. 935, 2009.
- BALU, D. T. The NMDA Receptor and Schizophrenia: From Pathophysiology to Treatment. **Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)**, v. 76, p. 351–382, 2016.
- BAN, T. A. Fifty years chlorpromazine: a historical perspective. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 3, n. 4, p. 495–500, 2007.
- BEHRENS, M. M. et al. Ketamine-Induced Loss of Phenotype of Fast-Spiking Interneurons Is Mediated by NADPH-Oxidase. **Science**, v. 318, n. 5856, p. 1645–1647, 2007.
- BENES, F. M. The GABA System in Schizophrenia: Cells, Molecules and Microcircuitry. **Schizophrenia Research**, v. 167, n. 1–3, p. 1–3, 2015.

BENVENUTTI, R. et al. How do zebrafish (*Danio rerio*) respond to MK-801 and amphetamine? Relevance for assessing schizophrenia-related endophenotypes in alternative model organisms. **Journal of Neuroscience Research**, 2021.

BERTONCELLO, K. T. et al. Taurine prevents memory consolidation deficits in a novel alcohol-induced blackout model in zebrafish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 93, p. 39–45, 2019.

BLANCHARD, D. C. et al. MK-801 produces a reduction in anxiety-related antipredator defensiveness in male and female rats and a gender-dependent increase in locomotor behavior. **Psychopharmacology**, v. 108, n. 3, p. 352–362, 1992.

BLANK, M. et al. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 92, n. 4, p. 529–534, 2009.

BRADLEY, A. J.; DINAN, T. G. A systematic review of hypothalamic–pituitary–adrenal axis function in schizophrenia: implications for mortality. **Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 24, n. 4_supplement, p. 91–118, 2010.

BRAIDA, D. et al. Hallucinatory and rewarding effect of salvinorin A in zebrafish: kappa-opioid and CB1-cannabinoid receptor involvement. **Psychopharmacology**, v. 190, n. 4, p. 441–448, 2007.

BROADBELT, K.; BYNE, W.; JONES, L. B. Evidence for a decrease in basilar dendrites of pyramidal cells in schizophrenic medial prefrontal cortex. **Schizophrenia Research**, v. 58, n. 1, p. 75–81, 2002.

BUBENÍKOVÁ-VALESOVÁ, V. et al. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 5, p. 1014–1023, 2008.

CACHAT, J. et al. Unique and potent effects of acute ibogaine on zebrafish: the developing utility of novel aquatic models for hallucinogenic drug research. **Behavioural Brain Research**, v. 236, n. 1, p. 258–269, 2013.

CAMMAROTA, M. et al. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. **Brain Research. Molecular Brain Research**, v. 76, n. 1, p. 36–46, 2000.

CANNON, T. D. et al. The genetic epidemiology of schizophrenia in a Finnish twin cohort. A population-based modeling study. **Archives of General Psychiatry**, v. 55, n. 1, p. 67–74, 1998.

CANTAFORA, A. et al. Effect of taurine administration on liver lipids in guinea pig. **Experientia**, v. 42, n. 4, p. 407–408, 1986.

CANZIAN, J. et al. Conspecific alarm substance differently alters group behavior of zebrafish populations: Putative involvement of cholinergic and purinergic signaling in anxiety- and fear-like responses. **Behavioural Brain Research**, v. 320, p. 255–263, 2017.

CANZIAN, J. et al. Modeling psychiatric comorbid symptoms of epileptic seizures in zebrafish. **Journal of Psychiatric Research**, v. 119, p. 14–22, 2019.

CASTELLANO, C. et al. MK-801-induced disruptions of one-trial inhibitory avoidance are potentiated by stress and reversed by naltrexone. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 72, n. 3, p. 215–229, 1999.

CHAN, C. Y. et al. Modes of direct modulation by taurine of the glutamate NMDA receptor in rat cortex. **European Journal of Pharmacology**, v. 728, p. 167–175, 2014.

CHANG, Y.-C. et al. Taurine homeostasis requires de novo synthesis via cysteine sulfinic acid decarboxylase during zebrafish early embryogenesis. **Amino Acids**, v. 44, n. 2, p. 615–629, 2013.

CHARTOFF, E. H.; HEUSNER, C. L.; PALMITER, R. D. Dopamine is not required for the hyperlocomotor response to NMDA receptor antagonists. **Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 7, p. 1324–1333, 2005.

CHAVES, A. C. Diferenças entre os sexos na esquizofrenia. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 22, p. 21–22, 2000.

CHEN, W. Q. et al. Role of taurine in regulation of intracellular calcium level and neuroprotective function in cultured neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 66, n. 4, p. 612–619, 2001.

COPLAN, J. D. et al. Effects of LY354740, a Novel Glutamatergic Metabotropic Agonist, on Nonhuman Primate Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Noradrenergic Function. **CNS Spectrums**, v. 6, n. 7, p. 607–617, 2001.

CORRELL, C. U.; SCHOOLER, N. R. Negative Symptoms in Schizophrenia: A Review and Clinical Guide for Recognition, Assessment, and Treatment. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 16, p. 519–534, 2020.

COX, J. A.; KUCENAS, S.; VOIGT, M. M. Molecular characterization and embryonic expression of the family of N-methyl-D-aspartate receptor subunit genes in the zebrafish. **Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, v. 234, n. 3, p. 756–766, 2005.

COYLE, J. T. Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 26, n. 4–6, p. 365–384, 2006.

COYLE, J. T. The glutamatergic dysfunction hypothesis for schizophrenia. **Harvard Review of Psychiatry**, v. 3, n. 5, p. 241–253, 1996a.

COYLE, J. T. The glutamatergic dysfunction hypothesis for schizophrenia. **Harvard Review of Psychiatry**, v. 3, n. 5, p. 241–253, 1996b.

CULL-CANDY, S. G.; LESZKIEWICZ, D. N. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. **Science's STKE: signal transduction knowledge environment**, v. 2004, n. 255, p. re16, 2004.

CURRAN, C. P.; MARCZINSKI, C. A. Taurine, caffeine, and energy drinks: Reviewing the risks to the adolescent brain. **Birth Defects Research**, v. 109, n. 20, p. 1640–1648, 2017.

DE ABREU, M. S. et al. Zebrafish as a Model of Neurodevelopmental Disorders. **Neuroscience**, 2019.

DE GREGORIO, D. et al. d-Lysergic Acid Diethylamide (LSD) as a Model of Psychosis: Mechanism of Action and Pharmacology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 11, p. E1953, 2016.

DE LUCA, A.; PIERNO, S.; CAMERINO, D. C. Taurine: the appeal of a safe amino acid for skeletal muscle disorders. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, p. 243, 2015.

DEMIN, K. A. et al. Developing zebrafish experimental animal models relevant to schizophrenia. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 105, p. 126–133, 2019.

DEMIN, K. A. et al. Understanding neurobehavioral effects of acute and chronic stress in zebrafish. **Stress (Amsterdam, Netherlands)**, p. 1–48, 2020.

DEUTSCH, S. I. et al. A Revised Excitotoxic Hypothesis of Schizophrenia: Therapeutic Implications:. **Clinical Neuropharmacology**, v. 24, n. 1, p. 43–49, 2001.

ECHEVARRIA, DAVID J. et al. International Journal of Comparative Psychology. **A Novel Behavioral Test Battery to Assess Global Drug Effects Using the Zebrafish**, University of Southern Mississippi, U.S.A., 2008. p. 19–34.

EL IDRISSEI, A. et al. Effects of taurine on anxiety-like and locomotor behavior of mice. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 643, p. 207–215, 2009.

ELKIS, H. A evolução do conceito de esquizofrenia neste século. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 22, p. 23–26, 2000.

ENGESZER, R. E. et al. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. **Zebrafish**, v. 4, n. 1, p. 21–40, 2007.

FARIA, M. H. G. et al. Expressão das proteínas BCL-2 e BAX em tumores astrocíticos humanos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, p. 271–278, 2006.

FIRTH, J. et al. Adjunctive nutrients in first-episode psychosis: A systematic review of efficacy, tolerability and neurobiological mechanisms. **Early Intervention in Psychiatry**, v. 12, n. 5, p. 774–783, 2018.

FONTANA, B. D. et al. Modulatory action of taurine on ethanol-induced aggressive behavior in zebrafish. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 141, p. 18–27, 2016.

FONTANA, B. D. et al. Taurine modulates acute ethanol-induced social behavioral deficits and fear responses in adult zebrafish. **Journal of Psychiatric Research**, v. 104, p. 176–182, 2018a.

FONTANA, B. D. et al. Taurine Protects from Pentylentetrazole-Induced Behavioral and Neurochemical Changes in Zebrafish. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 1, p. 583–594, 2019.

FONTANA, B. D. et al. The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. **Experimental Neurology**, v. 299, n. Pt A, p. 157–171, 2018b.

FONTANA, B. D. et al. Using zebrafish (*Danio rerio*) models to understand the critical role of social interactions in mental health and wellbeing. **Progress in Neurobiology**, p. 101993, 2021.

GAMA, C. S. et al. Elevated serum thiobarbituric acid reactive substances in clinically symptomatic schizophrenic males. **Neuroscience Letters**, v. 433, n. 3, p. 270–273, 2008.

GAWEL, K. et al. A critical review of zebrafish schizophrenia models: Time for validation?. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 107, p. 6–22, 2019.

GENG, Y.; PETERSON, R. T. The zebrafish subcortical social brain as a model for studying social behavior disorders. **Disease Models & Mechanisms**, v. 12, n. 8, p. dmm039446, 2019.

GISPEN-DE WIED, C. C. Stress in schizophrenia: an integrative view. **European Journal of Pharmacology**, v. 405, n. 1–3, p. 375–384, 2000.

GOBIRA, P. H. et al. Animal models for predicting the efficacy and side effects of antipsychotic drugs. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 35, p. S132–S139, 2013.

HARVEY, P. D.; STRASSNIG, M. T. Cognition and disability in schizophrenia: cognition-related skills deficits and decision-making challenges add to morbidity. **World Psychiatry**, v. 18, n. 2, p. 165–167, 2019.

HASHIMOTO, M.; HIBI, M. Development and evolution of cerebellar neural circuits. **Development, Growth & Differentiation**, v. 54, n. 3, p. 373–389, 2012.

HAYES, L. N. et al. Neuregulin 3 Knockout Mice Exhibit Behaviors Consistent with Psychotic Disorders. **Molecular Neuropsychiatry**, v. 2, n. 2, p. 79–87, 2016.

HEINRICHS, R. W.; ZAKZANIS, K. K. Neurocognitive deficit in schizophrenia: a quantitative review of the evidence. **Neuropsychology**, v. 12, n. 3, p. 426–445, 1998.

HILKER, R. et al. Heritability of Schizophrenia and Schizophrenia Spectrum Based on the Nationwide Danish Twin Register. **Biological Psychiatry**, v. 83, n. 6, p. 492–498, 2018.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013.

HOWES, O. D.; MCCUTCHEON, R. Inflammation and the neural diathesis-stress hypothesis of schizophrenia: a reconceptualization. **Translational Psychiatry**, v. 7, n. 2, p. e1024, 2017.

HOWES, O.; MCCUTCHEON, R.; STONE, J. Glutamate and dopamine in schizophrenia: an update for the 21st century. **Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 29, n. 2, p. 97–115, 2015.

HU, W. et al. The glutamate hypothesis of schizophrenia: evidence from human brain tissue studies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1338, p. 38–57, 2015.

HUNT, D. L.; CASTILLO, P. E. Synaptic plasticity of NMDA receptors: mechanisms and functional implications. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 22, n. 3, p. 496–508, 2012.

HUXTABLE, R. J. Physiological actions of taurine. **Physiological Reviews**, v. 72, n. 1, p. 101–163, 1992.

HUXTABLE, R.; BRESSLER, R. Effect of taurine on a muscle intracellular membrane. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 323, n. 4, p. 573–583, 1973.

JABLENSKY, A. The 100-year epidemiology of schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 28, n. 2–3, p. 111–125, 1997.

JAKARIA, M. et al. Taurine and its analogs in neurological disorders: Focus on therapeutic potential and molecular mechanisms. **Redox Biology**, v. 24, p. 101223, 2019.

JANNO, S. et al. Prevalence of neuroleptic-induced movement disorders in chronic schizophrenia inpatients. **The American Journal of Psychiatry**, v. 161, n. 1, p. 160–163, 2004.

JANSEN, L. M. et al. Blunted cortisol response to a psychosocial stressor in schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 33, n. 1–2, p. 87–94, 1998.

JAVITT, D. C.; ZUKIN, S. R. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. **The American Journal of Psychiatry**, v. 148, n. 10, p. 1301–1308, 1991.

JIA, F. et al. Taurine is a potent activator of extrasynaptic GABA(A) receptors in the thalamus. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 28, n. 1, p. 106–115, 2008.

JOËLS, M.; KARST, H.; SARABDJITSINGH, R. A. The stressed brain of humans and rodents. **Acta Physiologica (Oxford, England)**, v. 223, n. 2, p. e13066, 2018.

JONES, C. A.; WATSON, D. J. G.; FONE, K. C. F. Animal models of schizophrenia. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1162–1194, 2011.

KAHN, R. S. et al. Schizophrenia. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 1, p. 15067, 2015.

KALUEFF, A. V. et al. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 70–86, 2013.

KALUEFF, A. V.; ECHEVARRIA, D. J.; STEWART, A. M. Gaining translational momentum: more zebrafish models for neuroscience research. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 55, p. 1–6, 2014.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 2, p. 63–75, 2014.

KALUS, P. et al. The dendritic architecture of prefrontal pyramidal neurons in schizophrenic patients. **Neuroreport**, v. 11, n. 16, p. 3621–3625, 2000.

KEEFE, R. S. E.; EESLEY, C. E.; POE, M. P. Defining a cognitive function decrement in schizophrenia. **Biological Psychiatry**, v. 57, n. 6, p. 688–691, 2005.

- KIM, J. S. et al. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. **Neuroscience Letters**, v. 20, n. 3, p. 379–382, 1980.
- KOCHHAR, A.; ZIVIN, J. A.; MAZZARELLA, V. Pharmacologic studies of the neuroprotective actions of a glutamate antagonist in ischemia. **Journal of Neurotrauma**, v. 8, n. 3, p. 175–186, 1991.
- KOKEL, D.; PETERSON, R. T. Chemobehavioural phenomics and behaviour-based psychiatric drug discovery in the zebrafish. **Briefings in Functional Genomics & Proteomics**, v. 7, n. 6, p. 483–490, 2008.
- KOVACIC, P.; SOMANATHAN, R. Clinical physiology and mechanism of dizocilpine (MK-801): electron transfer, radicals, redox metabolites and bioactivity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 3, n. 1, p. 13–22, 2010.
- KOZLOWSKI, D. J. et al. Molecular characterization and expression pattern of taurine transporter in zebrafish during embryogenesis. **Life Sciences**, v. 82, n. 19–20, p. 1004–1011, 2008.
- KOZOL, R. A. et al. Function Over Form: Modeling Groups of Inherited Neurological Conditions in Zebrafish. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 9, p. 55, 2016.
- KURODA, K. et al. Investigation of Mechanisms for MK-801-Induced Neurotoxicity Utilizing Metabolomic Approach. **Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology**, v. 146, n. 2, p. 344–353, 2015.
- KYZAR, E. et al. Behavioral effects of bidirectional modulators of brain monoamines reserpine and d-amphetamine in zebrafish. **Brain Research**, v. 1527, p. 108–116, 2013.
- LAU, C. G.; ZUKIN, R. S. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 413–426, 2007.
- LAURSEN, T. M.; NORDENTOFT, M.; MORTENSEN, P. B. Excess Early Mortality in Schizophrenia. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 10, n. 1, p. 425–448, 2014.
- LAVRETSKY, H. HISTORY OF SCHIZOPHRENIA AS A PSYCHIATRIC DISORDER, p. 11,
- LEE, G.; ZHOU, Y. NMDAR Hypofunction Animal Models of Schizophrenia. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, p. 185, 2019.
- LEO, R. J.; REGNO, P. D. Atypical Antipsychotic Use in the Treatment of Psychosis in Primary Care. **Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry**, v. 2, n. 6, p. 194–204, 2000.

LI, P.; SNYDER, G. L.; VANOVER, K. E. Dopamine Targeting Drugs for the Treatment of Schizophrenia: Past, Present and Future. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 29, p. 3385–3403, 2016.

LIEBERMAN, J. A.; KANE, J. M.; ALVIR, J. Provocative tests with psychostimulant drugs in schizophrenia. **Psychopharmacology**, v. 91, n. 4, p. 415–433, 1987.

LÓPEZ-GIMÉNEZ, J. F.; GONZÁLEZ-MAESO, J. Hallucinogens and Serotonin 5-HT_{2A} Receptor-Mediated Signaling Pathways. **Current topics in behavioral neurosciences**, v. 36, p. 45–73, 2018.

LÖSCHER, W.; HÖNACK, D. The behavioural effects of MK-801 in rats: involvement of dopaminergic, serotonergic and noradrenergic systems. **European Journal of Pharmacology**, v. 215, n. 2–3, p. 199–208, 1992.

MAASWINKEL, H.; ZHU, L.; WENG, W. Assessing Social Engagement in Heterogeneous Groups of Zebrafish: A New Paradigm for Autism-Like Behavioral Responses. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e75955, 2013.

MANKOVSKAYA, I. N. et al. Mechanisms of taurine antihypoxic and antioxidant action. **High Altitude Medicine & Biology**, v. 1, n. 2, p. 105–110, 2000.

MARTIN, P. et al. MK-801-induced hyperlocomotion: differential effects of M100907, SDZ PSD 958 and raclopride. **European Journal of Pharmacology**, v. 335, n. 2–3, p. 107–116, 1997.

MARTIN, P.; CARLSSON, M. L.; HJORTH, S. Systemic PCP treatment elevates brain extracellular 5-HT: a microdialysis study in awake rats. **NeuroReport**, v. 9, n. 13, p. 2985–2988, 1998.

MCEWEN, B. S. Stress and the Individual: Mechanisms Leading to Disease. **Archives of Internal Medicine**, v. 153, n. 18, p. 2093, 1993.

MENEZES, F. P. et al. Evaluation of age-dependent response to NMDA receptor antagonism in zebrafish. **Zebrafish**, v. 12, n. 2, p. 137–143, 2015.

MENZIE, J. et al. Taurine and central nervous system disorders. **Amino Acids**, v. 46, n. 1, p. 31–46, 2014.

MENZIE, J.; PRENTICE, H.; WU, J.-Y. Neuroprotective Mechanisms of Taurine against Ischemic Stroke. **Brain Sciences**, v. 3, n. 2, p. 877–907, 2013.

MESHALKINA, D. A. et al. Zebrafish models of autism spectrum disorder. **Experimental Neurology**, v. 299, n. Pt A, p. 207–216, 2018.

MEZZOMO, N. J. et al. Taurine modulates the stress response in zebrafish. **Hormones and Behavior**, v. 109, p. 44–52, 2019.

MEZZOMO, N. J. et al. Taurine-mediated aggression is abolished via 5-HT_{1A} antagonism and serotonin depletion in zebrafish. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 199, p. 173067, 2020.

MEZZOMO, N. J. et al. The role of taurine on anxiety-like behaviors in zebrafish: A comparative study using the novel tank and the light-dark tasks. **Neuroscience Letters**, v. 613, p. 19–24, 2016.

MEZZOMO, N. J. et al. Understanding taurine CNS activity using alternative zebrafish models. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 90, p. 471–485, 2018.

MIYAMOTO, S. et al. Pharmacological treatment of schizophrenia: a critical review of the pharmacology and clinical effects of current and future therapeutic agents. **Molecular Psychiatry**, v. 17, n. 12, p. 1206–1227, 2012.

MOGHADDAM, B. et al. Activation of Glutamatergic Neurotransmission by Ketamine: A Novel Step in the Pathway from NMDA Receptor Blockade to Dopaminergic and Cognitive Disruptions Associated with the Prefrontal Cortex. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 2921–2927, 1997.

MOGHADDAM, B. Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. **Biological Psychiatry**, v. 51, n. 10, p. 775–787, 2002.

MUESER, K. T.; MCGURK, S. R. Schizophrenia. **Lancet (London, England)**, v. 363, n. 9426, p. 2063–2072, 2004.

NAM, R.-H.; KIM, W.; LEE, C.-J. NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the telencephalon of the zebrafish. **Neuroscience Letters**, v. 370, n. 2–3, p. 248–251, 2004.

NEELKANTAN, N. et al. Perspectives on Zebrafish Models of Hallucinogenic Drugs and Related Psychotropic Compounds. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 4, n. 8, p. 1137–1150, 2013.

NEILL, J. C. et al. Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 128, n. 3, p. 419–432, 2010.

- NG, M.-C. et al. Effect of MK-801-induced impairment of inhibitory avoidance learning in zebrafish via inactivation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in telencephalon. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 1099–1106, 2012.
- NOWAK, L. et al. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. **Nature**, v. 307, n. 5950, p. 462–465, 1984.
- NUECHTERLEIN, K. H. et al. Identification of separable cognitive factors in schizophrenia. **Schizophrenia Research**, v. 72, n. 1, p. 29–39, 2004.
- O'DONNELL, C. P. et al. Adjunctive Taurine in First-Episode Psychosis: A Phase 2, Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v. 77, n. 12, p. e1610–e1617, 2016.
- OJA, S. S.; SARANSAARI, P. Taurine and epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 104, n. 3, p. 187–194, 2013.
- OKAMOTO, K.; KIMURA, H.; SAKAI, Y. Evidence for taurine as an inhibitory neurotransmitter in cerebellar stellate interneurons: selective antagonism by TAG (6-aminomethyl-3-methyl-4H,1,2,4-benzothiadiazine-1,1-dioxide). **Brain Research**, v. 265, n. 1, p. 163–168, 1983a.
- OKAMOTO, K.; KIMURA, H.; SAKAI, Y. Taurine-induced increase of the Cl⁻ conductance of cerebellar Purkinje cell dendrites in vitro. **Brain Research**, v. 259, n. 2, p. 319–323, 1983b.
- OZYURT, B. et al. Oxidative stress in prefrontal cortex of rat exposed to MK-801 and protective effects of CAPE. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 31, n. 4, p. 832–838, 2007.
- PANULA, P. et al. Modulatory neurotransmitter systems and behavior: towards zebrafish models of neurodegenerative diseases. **Zebrafish**, v. 3, n. 2, p. 235–247, 2006.
- PAOLETTI, P.; BELLONE, C.; ZHOU, Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 383–400, 2013.
- PHAM, M. et al. Assessing Social Behavior Phenotypes in Adult Zebrafish: Shoaling, Social Preference, and Mirror Biting Tests. 2012.
- RABINOWITZ, J. et al. Negative symptoms have greater impact on functioning than positive symptoms in schizophrenia: analysis of CATIE data. **Schizophrenia Research**, v. 137, n. 1–3, p. 147–150, 2012.

- RAEDLER, T. J. Cardiovascular aspects of antipsychotics. **Current Opinion in Psychiatry**, v. 23, n. 6, p. 574–581, 2010.
- REYNOLDS, G. P. The neurochemistry of schizophrenia. **Psychiatry**, v. 4, n. 10, Schizophrenia 1, p. 21–25, 2005.
- RIEDEL, G.; PLATT, B.; MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. **Behavioural Brain Research**, v. 140, n. 1–2, p. 1–47, 2003.
- RIEDEL, G.; REYMANN, K. G. Metabotropic glutamate receptors in hippocampal long-term potentiation and learning and memory. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 157, n. 1, p. 1–19, 1996.
- ROSEMBERG, D. B. et al. Behavioral effects of taurine pretreatment in zebrafish acutely exposed to ethanol. **Neuropharmacology**, v. 63, n. 4, p. 613–623, 2012.
- ROSEMBERG, D. B. et al. Taurine prevents enhancement of acetylcholinesterase activity induced by acute ethanol exposure and decreases the level of markers of oxidative stress in zebrafish brain. **Neuroscience**, v. 171, n. 3, p. 683–692, 2010.
- ROY, S. et al. Role of membrane cholesterol and lipid peroxidation in regulating the Na⁺/K⁺-ATPase activity in schizophrenia. **Indian Journal of Psychiatry**, v. 58, n. 3, p. 317–325, 2016.
- RUNG, J. P. et al. (+)-MK-801 induced social withdrawal in rats; a model for negative symptoms of schizophrenia. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 5, p. 827–832, 2005.
- SADOUL, B.; GEFFROY, B. Measuring cortisol, the major stress hormone in fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 94, n. 4, p. 540–555, 2019.
- SAHA, S. et al. A Systematic Review of the Prevalence of Schizophrenia. **PLOS Medicine**, v. 2, n. 5, p. e141, 2005.
- SAMUELSSON, M. et al. Taurine and glutathione in plasma and cerebrospinal fluid in olanzapine treated patients with schizophrenia. **Psychiatry Research**, [s. l.], v. 210, n. 3, p. 819–824, 2013.
- SCHAFFER, S. W. et al. Physiological roles of taurine in heart and muscle. **Journal of Biomedical Science**, v. 17 Suppl 1, p. S2, 2010.
- SCHAFFER, S.; KIM, H. W. Effects and Mechanisms of Taurine as a Therapeutic Agent. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 26, n. 3, p. 225–241, 2018.

SEIBT, K. J. et al. Antipsychotic drugs prevent the motor hyperactivity induced by psychotomimetic MK-801 in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 214, n. 2, p. 417–422, 2010.

SEIBT, K. J. et al. Antipsychotic drugs reverse MK-801-induced cognitive and social interaction deficits in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 224, n. 1, p. 135–139, 2011.

SEIBT, K. J. et al. MK-801 alters Na⁺, K⁺-ATPase activity and oxidative status in zebrafish brain: reversal by antipsychotic drugs. **Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)**, v. 119, n. 6, p. 661–667, 2012.

SHAO, A.; HATHCOCK, J. N. Risk assessment for the amino acids taurine, L-glutamine and L-arginine. **Regulatory toxicology and pharmacology: RTP**, v. 50, n. 3, p. 376–399, 2008.

SISON, M.; GERLAI, R. Behavioral performance altering effects of MK-801 in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 220, n. 2, p. 331–337, 2011.

SONG, X. et al. Mechanism of NMDA receptor channel block by MK-801 and memantine. **Nature**, v. 556, n. 7702, p. 515–519, 2018.

SPEEDIE, N.; GERLAI, R. Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 188, n. 1, p. 168–177, 2008.

STAHL, Stephen. *Psicofarmacologia: Bases Neurocientíficas e Aplicações Práticas*. 4. ed. Porto Alegre: Guanabara Koogan, 2017.

STEFANELLO, F. V. et al. Taurine modulates behavioral effects of intermittent ethanol exposure without changing brain monoamine oxidase activity in zebrafish: Attenuation of shoal- and anxiety-like responses, and abolishment of memory acquisition deficit. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 209, p. 173256, 2021.

STEWART, A. M. et al. Molecular psychiatry of zebrafish. **Molecular Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 2–17, 2015.

STURMAN, J. A.; MESSING, J. M. High dietary taurine effects on feline tissue taurine concentrations and reproductive performance. **The Journal of Nutrition**, v. 122, n. 1, p. 82–88, 1992.

SWAIN, H. A.; SIGSTAD, C.; SCALZO, F. M. Effects of dizocilpine (MK-801) on circling behavior, swimming activity, and place preference in zebrafish (*Danio rerio*). **Neurotoxicology and Teratology**, v. 26, n. 6, p. 725–729, 2004.

SWEATT J. D. Chapter 8 - The NMDA receptor. *In: MECHANISMS OF MEMORY*. 2. ed.: Elsevier, 2010. (Academic Press). p. 190–201. *E-book*. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123749512000081>. Acesso em: 23 jan. 2020.

TAN, X. W. et al. Subjective quality of life among patients with schizophrenia spectrum disorder and patients with major depressive disorder. **BMC Psychiatry**, v. 19, n. 1, p. 267, 2019.

TANDON, R.; KESHAVAN, M. S.; NASRALLAH, H. A. Schizophrenia, “Just the Facts”: what we know in 2008 part 1: overview. **Schizophrenia Research**, v. 100, n. 1–3, p. 4–19, 2008.

TANDON, R.; NASRALLAH, H. A.; KESHAVAN, M. S. Schizophrenia, “just the facts” 4. Clinical features and conceptualization. **Schizophrenia Research**, v. 110, n. 1–3, p. 1–23, 2009.

THIRUPATHI, A. et al. Modulatory effects of taurine on metabolic and oxidative stress parameters in a mice model of muscle overuse. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 54, p. 158–164, 2018.

TRAN, S. et al. MK-801 increases locomotor activity in a context-dependent manner in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 296, p. 26–29, 2016.

TRAYNELIS, S. F. et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. **Pharmacological Reviews**, v. 62, n. 3, p. 405–496, 2010.

TRIPATHI, A.; KAR, S. K.; SHUKLA, R. Cognitive Deficits in Schizophrenia: Understanding the Biological Correlates and Remediation Strategies. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience: The Official Scientific Journal of the Korean College of Neuropsychopharmacology**, v. 16, n. 1, p. 7–17, 2018.

UNO, Y.; COYLE, J. T. Glutamate hypothesis in schizophrenia. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 73, n. 5, p. 204–215, 2019.

VAN OS, J.; KENIS, G.; RUTTEN, B. P. F. The environment and schizophrenia. **Nature**, v. 468, n. 7321, p. 203–212, 2010.

VOLZ, H. R. et al. Reduced phosphodiesterases and high-energy phosphates in the frontal lobe of schizophrenic patients: a (31)P chemical shift spectroscopic-imaging study. **Biological Psychiatry**, v. 47, n. 11, p. 954–961, 2000.

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, n. 3, p. 591–625, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (org.). **The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: clinical descriptions and diagnostic guidelines**. Geneva: World Health Organization, 1992.

WOZNIAK, D. F. et al. MK-801 neurotoxicity in male mice: histologic effects and chronic impairment in spatial learning. **Brain Research**, v. 707, n. 2, p. 165–179, 1996.

WU, G.-F. et al. Antidepressant effect of taurine in chronic unpredictable mild stress-induced depressive rats. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4989, 2017.

WU, H. et al. Mode of action of taurine as a neuroprotector. **Brain Research**, v. 1038, n. 2, p. 123–131, 2005.

WU, J.-Y.; PRENTICE, H. Role of taurine in the central nervous system. **Journal of Biomedical Science**, v. 17 Suppl 1, p. S1, 2010.

WU, J. Y.; TANG, X. W.; TSAI, W. H. Taurine receptor: kinetic analysis and pharmacological studies. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 315, p. 263–268, 1992.

YANG, B. et al. Sustained antidepressant action of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 in a chronic unpredictable mild stress model. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 2018. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2018.6876>. Acesso em: 12 ago. 2020.

YE, H.-B.; SHI, H.-B.; YIN, S.-K. Mechanisms underlying taurine protection against glutamate-induced neurotoxicity. **The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques**, v. 40, n. 5, p. 628–634, 2013.

YEHUDA, R. Post-traumatic stress disorder. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 2, p. 108–114, 2002.

ZHANG, M. et al. A meta-analysis of oxidative stress markers in schizophrenia. **Science China. Life Sciences**, v. 53, n. 1, p. 112–124, 2010.

ZIMMERMANN, F. F. et al. Oxytocin reversed MK-801-induced social interaction and aggression deficits in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 311, p. 368–374, 2016.

ANEXO I – CARTA DE APROVAÇÃO DO CEUA – ARTIGOS 1 e 2



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos neuroprotetores da taurina na modulação de respostas comportamentais e bioquímicas em um modelo de hipofunção glutamatérgica induzido por MK-801 em peixe-zebra (*Danio rerio*)", protocolada sob o CEUA nº 6398060519 (ID 002535), sob a responsabilidade de **Denis Broock Roseberg e equipe; Francini Francescon; Julia Canzian Marion; Talise Ellwanger Müller; Paula Michelotti; Thiele Piber de Souza; Vânia Lucia Loro; Bernardo Baldisserotto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 04/06/2019.

We certify that the proposal "Investigation of the neuroprotective effects of taurine in modulating behavioral and biochemical responses in a zebrafish model of glutamatergic hypofunction caused by MK-801", utilizing 560 Fishes (males and females), protocol number CEUA 6398060519 (ID 002535), under the responsibility of **Denis Broock Roseberg and team; Francini Francescon; Julia Canzian Marion; Talise Ellwanger Müller; Paula Michelotti; Thiele Piber de Souza; Vânia Lucia Loro; Bernardo Baldisserotto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 06/04/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **07/2019** a **06/2021** Área: **Bioquímica E Biologia Molecular**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Peixes**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **4 a 6 meses**

N: **560**

Linhagem: **Danio rerio**

Peso: **0350 a 0680 g**

Local do experimento: Laboratório de Fisiologia de Peixes (LAFIPE), UFSM, CCS - Departamento de Farmacologia e Fisiologia.

Santa Maria, 10 de janeiro de 2022

Dra. Patrícia Bräunig
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Vania Lucia Loro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

ANEXO II – PRORROGAÇÃO DA CARTA DE APROVAÇÃO DO CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Federal de Santa Maria

Santa Maria, 20 de abril de 2021
CEUA N 6398060519

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Denis Broock Rosemberg
Área: Bioquímica E Biologia Molecular

Título da proposta: "Avaliação dos efeitos neuroprotetores da taurina na modulação de respostas comportamentais e bioquímicas em um modelo de hipofunção glutamatérgica induzido por MK-801 em peixe-zebra (Danio rerio)".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFSM (ID 002715)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 23/março/2021) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Em função da pandemia, as atividades presenciais relacionadas à pesquisa no laboratório encontram-se suspensas e algumas etapas do projeto não puderam ser devidamente realizadas, também pela dificuldade da compra de alguns reagentes básicos importados. Assim, buscamos estender a vigência do prazo de término da pesquisa para que as atividades propostas possam ser executadas de modo satisfatório, sem a necessidade de animais adicionais para os experimentos. O cronograma será alterado, portanto, para previsão de término em 04/2023".

Comentário da CEUA: "Emenda aprovada. Nova previsão de término: 04/2023".

Dra. Patrícia Bräunig
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Vania Lúcia Loro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

ANEXO III – PRODUÇÕES CIENTÍFICAS EM COLABORAÇÃO

Artigos produzidos em parceria durante o período do doutorado:

1) Fontana BD, **Francescon F**, Rosemberg DB, Norton WHJ, Kalueff AV, Parker MO. Zebrafish models for attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Neurosci Biobehav Rev*. 2019 May;100:9-18. doi: 10.1016/j.neubiorev.2019.02.009.

2) Bertoncello KT, Müller TE, Fontana BD, **Francescon F**, Filho GLB, Rosemberg DB. Taurine prevents memory consolidation deficits in a novel alcohol-induced blackout model in zebrafish. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2019 Jul 13;93:39-45. doi: 10.1016/j.pnpbp.2019.03.006.

3) Mezzomo NJ, Müller TE, **Francescon F**, Michelotti P, Souza TP, Rosemberg DB, Barcellos LJG. Taurine-mediated aggression is abolished via 5-HT1A antagonism and serotonin depletion in zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav*. 2020 Dec;199:173067. doi: 10.1016/j.pbb.2020.173067.

4) **Francescon F**, Mazon SC, Bertoncello KT, Boligon AA, Sachett A, Rambo CL, Rosemberg DB, Magro JD, Siebel AM. Protective role of jaboticaba *Plinia peruviana* peel extract in copper-induced cytotoxicity in *Allium cepa*. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018 Dec;25(35):35322-35329. doi: 10.1007/s11356-018-3420-1.

5) Canzian J, Müller TE, **Francescon F**, Michelotti P, Fontana BD, Costa FV, Rosemberg DB. Modeling psychiatric comorbid symptoms of epileptic seizures in zebrafish. *J Psychiatr Res*. 2019 Dec;119:14-22. doi: 10.1016/j.jpsychires.2019.09.007.

6) Canzian J, **Francescon F**, Müller TE, Stefanello FV, Souza TP, Rosa LV, Rosemberg DB. Stress increases susceptibility to pentylenetetrazole-induced seizures in adult zebrafish. *Epilepsy Behav*. 2021 Jan;114(Pt A):107557. doi: 10.1016/j.yebeh.2020.107557.

7) Müller TE, Fontana BD, Bertoncello KT, **Francescon F**, Mezzomo NJ, Canzian J, Stefanello FV, Parker MO, Gerlai R, Rosemberg DB. Understanding the neurobiological effects of drug abuse: Lessons from zebrafish models. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*.

2020 Jun 8;100:109873. doi: 10.1016/j.pnpbp.2020.109873.

8) Stefanello FV, Müller TE, **Franscescon F**, Quadros VA, Souza TP, Canzian J, Leitemperger J, Loro VL, Rosemberg DB. Taurine modulates behavioral effects of intermittent ethanol exposure without changing brain monoamine oxidase activity in zebrafish: Attenuation of shoal- and anxiety-like responses, and abolishment of memory acquisition deficit. *Pharmacol Biochem Behav.* 2021 Oct;209:173256. doi: 10.1016/j.pbb.2021.173256.

9) Souza TP, **Franscescon F**, Stefanello FV, Müller TE, Santos LW, Rosemberg DB. Acute effects of ethanol on behavioral responses of male and female zebrafish in the open field test with the influence of a non-familiar object. *Behav Processes.* 2021 Oct;191:104474. doi: 10.1016/j.beproc.2021.104474.

10) Michelotti P, **Franscescon F**, Müller TE, Rosemberg DB, Pereira ME. Ketamine acutely impairs memory consolidation and repeated exposure promotes stereotyped behavior without changing anxiety- and aggression-like parameters in adult zebrafish. *Physiology & Behavior.* 2022, Jan; 247:113708. doi.org/10.1016/j.physbeh.2022.113708.

11) Canzian J, Gonçalves FLS, Müller TE, **Franscescon F**, Santos LW, Adedara IA, Rosemberg DB. Zebrafish as a potential non-traditional model organism in translational bipolar disorder research: Genetic and behavioral insights. *Neurosci Biobehav Rev.* 2022 Mar 14;136:104620. doi: 10.1016/j.neubiorev.2022.104620. Epub ahead of print. PMID: 35300991.