

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

MILENE DORNELLES LUZARDO

Influência da ativação e bloqueio dos receptores adenosinérgicos na  
fosforilação da proteína Tau em peixe zebra (*Danio rerio*)

Porto Alegre  
2013

MILENE DORNELLES LUZARDO

Influência da ativação e bloqueio dos receptores adenosinérgicos na fosforilação da proteína Tau em peixe zebra (*Danio rerio*)

Monografia apresentada como requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Porto Alegre

2013

*“Pense, acredite, sonhe e atreva-se”*

**Walt Disney**

## RESUMO

A doença de Alzheimer é uma desordem neurodegenerativa progressiva que vem crescendo em função do aumento populacional e do aumento da expectativa de vida e consequentemente tornando-se um grande problema para a população mundial. Já se tem conhecimento que a presença de placas senis, formadas por agregados de peptídeo beta-amilóide (A $\beta$ ), e de emaranhados neurofibrilares, consequentes da hiperfosforilação da proteína Tau, caracterizam essa doença, porém a sua causa permanece desconhecida. A Tau é uma fosfoproteína responsável pela estabilização dos microtúbulos, mas ao ser hiperfosforilada causa uma desestruturação dos microtúbulos e posterior fibrilação e deposição em forma de emaranhados neurofibrilares que levam à progressiva degeneração dos neurônios. A adenosina é um nucleosídeo de papel neuromodulador e homeostático que exerce seus efeitos através da ativação de receptores purinérgicos P1, sendo os receptores A1 e A2a de alta afinidade e os mais estudados. O sistema adenosinérgico vem ganhando destaque em estudos de patologia do SNC e seus receptores são considerados alvos promissores para o tratamento de doenças neurodegenerativas. Tendo isso em vista, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito da ativação e do bloqueio de receptores adenosinérgicos na fosforilação da proteína TAU, utilizando como modelo experimental um peixe zebra (*Danio rerio*) transgênico usado no estudo de tauopatias, que possuem a proteína associada à FTD humana (demência frontotemporal), a hTAU-P301L, que induz a hiperfosforilação da Tau em apenas 32hpf. A fim de quantificar a Tau hiperfosforilada, os animais terão o sistema nervoso dissecado e essa amostra será submetida à técnica de *Western Blot*. A partir do conhecimento proporcionado por esse estudo, espera-se que seja possível propor novas drogas neuroprotetoras que atuem no sistema adenosinérgico impedindo que a proteína Tau seja hiperfosforilada, evitando a formação dos emaranhados neurofibrilares.

**Palavras-chave:** Doença de Alzheimer. Proteína Tau. *Zebrafish*. Sistema adenosinérgico.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative disorder that is growing due to increased population and increased life expectancy and consequently becoming a big problem for the global population. It is known that the presence of senile plaques formed by aggregates of beta-amyloid peptide (A $\beta$ ) and neurofibrillary tangles, resulting in hyperphosphorylation of Tau protein, characterize this disease, but its cause remains unknown. Tau is a phosphoprotein responsible for the stabilization of microtubules, but when hyperphosphorylated induces a disruption of microtubules and subsequent fibrillation and deposition in the form of neurofibrillary tangles that lead to progressive degeneration of neurons. The adenosine is a nucleoside with neuromodulator and homeostatic role, which exerts its effects through the activation of purinergic receptors P1, being A1 and A2a receptors of high affinity and most studied. The adenosinergic system have been gaining attention in studies of CNS pathology and their receptors are considered promising targets for the treatment of neurodegenerative diseases. Keeping this in view, the aim of this work is to evaluate the effect of activation and blockade of adenosine receptors in the phosphorylation of the protein Tau, using as a model organism a transgenic zebrafish (*Danio rerio*) used in the study of tauopathies, which have been associated protein with human FTD protein, the hTAU-P301L, which leads to hyperphosphorylation of Tau in 32hpf only. In order to quantify the hyperphosphorylated Tau, the animals will have its nervous system dissected and the samples will be subjected to Western Blot. We expect to provide valuable informations for future efforts aiming to develop new neuroprotective drugs that act on the adenosinergic system and block hyperphosphorylation of Tau protein, preventing the formation of neurofibrillary tangles.

**Keywords:** Alzheimer disease. Tau protein. *Zebrafish*. Adenosinergic system.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Proteína Tau estabilizando os microtúbulos .....	9
Figura 2: Fosforilação da proteína Tau e formação dos emaranhados neurofibrilares. ....	10
Figura 3: Fontes de adenosina nos botões sinápticos.....	11

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	8
1.1	Doença de Alzheimer .....	8
1.2	Proteína Tau .....	9
1.3	Sistema Adenosinérgico .....	10
1.4	<i>Zebrafish</i> .....	12
2	JUSTIFICATIVA .....	14
3	OBJETIVOS .....	15
3.1	Objetivo Geral .....	15
3.1	Objetivos Específicos .....	15
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	16
4.1	Local de execução .....	16
4.2	Animais.....	16
4.3	Exposições a agonistas e antagonistas de receptores adenosinérgicos .....	16
4.4	<i>Western Blotting</i> .....	17
5	RESULTADOS ESPERADOS .....	18
	REFERÊNCIAS.....	19
	ANEXOS	
	Anexo 01 - Cronograma	
	Anexo 02 - Orçamento	

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer é uma desordem neurodegenerativa progressiva e a principal responsável por causar comprometimento cognitivo e demência em idosos (1). É caracterizada pela presença de placas senis, formadas por agregados de peptídeo beta-amilóide, e por emaranhados neurofibrilares, consequentes da hiperfosforilação da proteína Tau. Em 2010 estimou-se cerca de 36 milhões de casos no mundo e acredita-se que esse número dobrará a cada vinte anos devido ao aumento populacional e ao aumento da expectativa de vida (2).

Os sintomas iniciais dessa patologia incluem perda de capacidades intelectuais e de memória e podem ser tão sutis que muitas vezes passam despercebidos. Com a progressão da doença aparecem novos sintomas como confusão mental, irritabilidade, agressividade, alterações de humor, falhas na linguagem e perda de noção da realidade. Com a degeneração progressiva dos neurônios o paciente começa a tornar-se dependente, pois perde a capacidade de realizar tarefas diárias, de ler e escrever e pode deixar de reconhecer os seus parentes e conhecidos. Na fase terminal da doença o sistema imunológico é deteriorado, aumentando o risco de infecções, principalmente nos pulmões, que podem levar o paciente ao óbito (3).

A doença de Alzheimer afeta, principalmente, idosos de ambos os sexos que já tiveram essa patologia diagnosticada em outros membros da família, porém pode afetar também portadores da síndrome de Down e pessoas que já sofreram traumatismo craniano. A principal forma de retardar o aparecimento da doença é através da aquisição de conhecimento, pois aumenta a reserva cognitiva criando novas conexões entre os neurônios (4).

Apesar da quantidade de estudos existentes sobre essa patologia, a real causa da doença permanece desconhecida. Antigamente o diagnóstico é baseado em suposições criadas depois de analisar o histórico familiar do paciente, realizar testes psicológicos, excluir outros tipos de patologias e a doença só era realmente confirmada após a identificação de placas senis e emaranhados neurofibrilares através de biópsia. Atualmente já existem outros métodos para a detecção precoce da patologia, entre eles



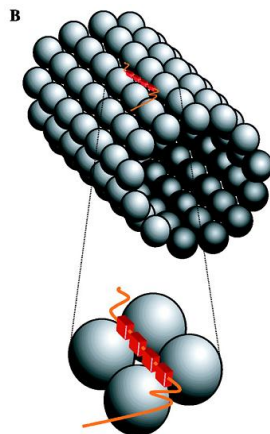
está o FDG PET, sendo uma tomografia por emissão de pósitrons (PET) que detecta o análogo da glicose Fluoro-2-deoxiglicose (FDG), mostrando a taxa metabólica da glicose cerebral, que é reduzida na doença de Alzheimer (5). O BOLD fMRI também é um método para detecção da patologia, no qual é realizado uma ressonância magnética funcional (fMRI) que detecta os níveis de oxigenação no sangue (BOLD) (6).

### 1.2 Proteína Tau

A proteína Tau é uma fosfoproteína encontrada amplamente no sistema nervoso central e periférico (7) e pertence à família das MAP's (*microtubule associated proteins*). Sua principal função é a estabilização dos microtúbulos, através da regulação da polimerização e despolimerização deles durante o processo de extensão axonal. Os microtúbulos são componentes essenciais do citoesqueleto neuronal, pois são fundamentais no processo de divisão celular, além de, nos neurônios, serem importantes para o transporte axonal de organelas e de vesículas, nas quais são deslocados neurotransmissores e proteínas do corpo celular para as sinapses distais (8). Nos axônios, os microtúbulos estão uniformemente orientados devido ao papel da proteína Tau.

A proteína Tau atua estabilizando os polímeros de alfa e beta- tubulinas (proteínas globulares que compõem os microtúbulos) e tem sua atividade regulada por mecanismos de fosforilação e de desfosforilação (9).

**Figura 1:** Proteína Tau estabilizando os microtúbulos

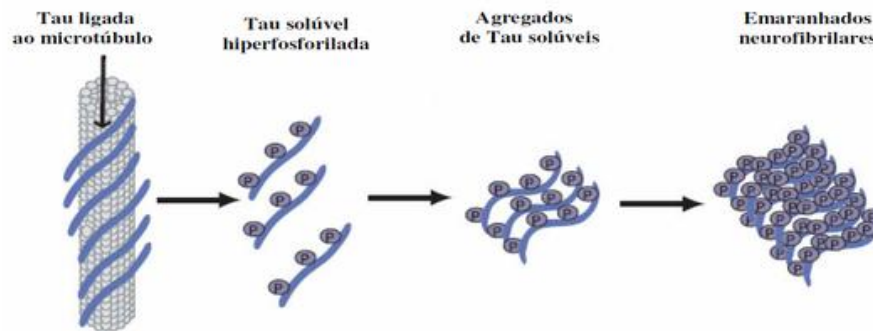


Fonte: Jesus Avila et al. (2004) (10)

Nota: Em destaque a ligação da proteína Tau a dímeros de Tubulina.

Sob ação de enzimas quinases, como a GSK-3 $\beta$ , a Tau pode ser hiperfosforilada, diminuindo sua afinidade com as tubulinas e causando uma desestruturação dos microtúbulos e posterior fibrilação e deposição em forma de emaranhados neurofibrilares que levam à progressiva degeneração dos neurônios.

**Figura 2:** Fosforilação da proteína Tau e formação dos emaranhados neurofibrilares.



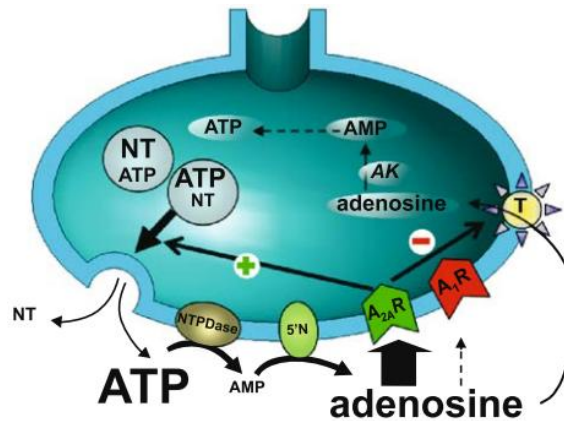
Fonte: Golde (2006) (11)

Depósitos de peptídeo Beta-Amilóide (A $\beta$ ) e de Tau hiperfosforilada são as principais características do Alzheimer. Embora existam diversos estudos sobre o envolvimento do A $\beta$  nesta doença, o conhecimento sobre a participação da Tau nessa patologia ainda é escasso (12). Estudos mostraram que diminuir os níveis da Tau melhora os deficit causados pelo A $\beta$  (13), porém a falta de conhecimento necessário sobre esse mecanismo impede que novas drogas sejam propostas para o tratamento dessa doença. As drogas disponíveis no mercado até o momento não são capazes de modificar o estado da doença, apenas melhoram o aspecto cognitivo ou desaceleram a degeneração dos neurônios.

### 1.3 Sistema Adenosinérgico

A adenosina é um nucleosídeo presente no meio intra e extracelular que possui disponibilidade altamente controlada, devido seu papel neuromodulador e homeostático (14). Esse nucleosídeo pode ser proveniente de transportadores bidirecionais ou produzido através de uma cascata enzimática a partir de AMP (Figura 3).

Figura 3: Fontes de adenosina nos botões sinápticos



Fonte: Cunha, R.A (2005) (15)

O ATP é uma fonte primária de substrato para essa cascata enzimática de produção de adenosina. Nucleotídeos - 5'- trifosfatados e difosfatados, como o ATP e o ADP, tem seus níveis extracelulares controlados pela ação da enzima E-NTPDase, localizadas na superfície celular ou na forma solúvel (16). Nucleotídeos -5'- monofosfatados, como o AMP, sofrem ação da ecto -5'- nucleotidase, sendo esse o passo limitante para formação extracelular de adenosina.

A adenosina exerce seus efeitos através da ativação de receptores de membrana específicos, denominados receptores purinérgicos P1 (17). Existem quatro subtipos de receptores P1, sendo eles A1, A2a, A2b e A3, que diferem quanto a sua afinidade pela adenosina, as estruturas moleculares, a distribuição tecidual e o perfil farmacológico (18,19), sendo o A1 e A2a de alta afinidade e o A2b e A3 de baixa afinidade pela adenosina (20).

Dentre os receptores adenosinérgicos, os receptores A1 existem em maior abundância no SNC de mamíferos, com alta expressão no córtex cerebral, hipocampo, cerebelo, tálamo, tronco cerebral e medula espinhal (19). A localização celular dos receptores A1 é pré-sináptica, pós-sináptica e no axônio (21,22) e sua ativação promove efeitos inibitórios na neurotransmissão, diminuindo as concentrações de AMPc. Os receptores A2a são de alta afinidade pela adenosina, são expressos na região pré e pós-sináptica e são encontrados no sistema nervoso central, basicamente no estriado, núcleo accumbens e tubérculo olfatório (23). A ativação desse subtipo de receptor adenosinérgico desencadeia uma resposta antagônica àquela dos receptores do tipo A1, aumentando os níveis de AMPc (24,25,26). Os receptores do tipo A2b e A3 são de baixa

afinidade pela adenosina e o conhecimento sobre sua ativação ou inibição é menos conhecido devido à sua expressão difusa e ao menor número de ferramentas farmacológicas específicas para esses receptores.

A presença de diferentes receptores adenosinérgicos em um mesmo tipo celular levanta a questão da interação entre estes receptores. Em células que possuem subtipos de receptores funcionais com semelhante afinidade pela adenosina, como o A1 e A2a, a determinação do receptor que será ativado depende da fonte de adenosina extracelular. Os receptores A2a são preferencialmente ativados quando a adenosina extracelular resulta da ação das ecto-nucleotidases sobre os nucleotídeos liberados na fenda sináptica (27,28). A ativação dos receptores A1 ocorre preferencialmente quando a adenosina é liberada através de seus transportadores específicos (14,20).

A utilização de agonistas, capazes de ativar os receptores, e antagonistas, capazes de bloquear os receptores, é uma importante forma de analisar o sistema adenosinérgico e sua interação com sistemas de neurotransmissão. Agonistas e antagonistas foram desenvolvidos para realizar intervenções que possam ser utilizadas como ferramentas terapêuticas em diversas patofisiologias.

Cada vez mais o sistema adenosinérgico ganha destaque em estudos de patologia do SNC e seus receptores têm sido considerados alvos promissores para o tratamento de doenças neurodegenerativas. Já foi descrito que no início de situações nocivas a ativação dos receptores A1 é capaz de atenuar o dano cerebral e o bloqueio dos receptores A2a confere proteção contra a toxicidade do peptídeo Beta-Amilóide, porém não existem estudos sobre a influência de tais receptores na fosforilação da proteína Tau.

#### *1.4 Zebrafish*

O peixe zebra (*Danio rerio*), conhecido mundialmente como *Zebrafish*, é um pequeno teleosteo pertencente à família Cyprinidae, uma das mais ricas em representantes entre os vertebrados, e é encontrado no sul e sudeste da Ásia (29). Possui de 3 a 5cm de comprimento e é caracterizado por seu padrão de coloração distinto, baseado em linhas horizontais claras e escuras alternadas.

O baixo custo e espaço necessário para manutenção tornam o *Zebrafish* um modelo experimental muito utilizado, além disso, ele possui reprodução em larga escala, fertilização externa e larvas e embriões transparentes, características que facilitam muitos estudos.

Cada vez mais o número de metodologias e ferramentas disponíveis para seu estudo e sua melhor caracterização está aumentando. Inicialmente, esse modelo era empregado em estudos de biologia do desenvolvimento e genética molecular, mas atualmente já é muito aplicado em análises bioquímicas, farmacológicas e toxicológicas (30,31,32), além de estudos em neurobiologia e comportamento (33,34,35).

Apesar de apresentar menor complexidade, já foi descrito que o SNC do *Zebrafish* possui organização geral e circuitos neuronais semelhantes ao que é observado em mamíferos (36). Outros estudos que investigavam o sistema purinérgico já mostraram que esse teleósteo possui gene homólogo do receptor P2X3 e P1 (A1 e A2) aos receptores de humanos e roedores (37). Devido à duplicação genômica ocorrida nos teleósteos, o *Zebrafish* apresenta duas cópias para o receptor A2A, denominados, A2A1 e A2A2 (37).

Em comparação com o SNC humano, o peixe zebra apresenta organização cerebral básica, neuroanatomia e neuroquímica semelhantes, mostrando que esse modelo é capaz de apresentar condições adequadas de representar alterações patológicas das desordens humanas. Além disso, o genoma do *Zebrafish* contém ortólogos altamente conservados de cada uma das quinases envolvidas na fosforilação da Tau (38).

## 2 JUSTIFICATIVA

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa progressiva e a causa mais comum de demência em idosos. Em 2010 estimou-se cerca de 36 milhões de casos no mundo e acredita-se que esse número dobrará a cada vinte anos devido ao aumento populacional. O sistema adenosinérgico vem ganhando destaque em estudos de patologias do SNC e seus receptores são considerados alvos promissores para o tratamento de doenças neurodegenerativas. Estudos anteriores mostraram que a ativação dos receptores A1 atenua o dano cerebral no início de situações nocivas e que o bloqueio dos receptores A2a confere proteção contra a toxicidade do peptídeo beta-amilóide. Entretanto, a hiperfosforilação da proteína Tau, que forma os emaranhados neurofibrilares, também é uma importante característica da doença de Alzheimer, mas seu envolvimento com o sistema adenosinérgico é pouco estudado. Drogas que impeçam a hiperfosforilação da Tau através do sistema adenosinérgico podem ter um grande potencial terapêutico, porém para propor tais drogas é preciso entender como esse sistema atua na fosforilação dessa proteína.

### **3 OBJETIVOS**

#### *3.1 Objetivo Geral*

Avaliar o efeito da ativação e do bloqueio de receptores adenosinérgicos na fosforilação da proteína TAU em peixe zebra (*Danio rerio*).

#### *3.2 Objetivos Específicos*

- Avaliar o efeito da ativação de receptores adenosinérgicos do tipo A1 e A2a com agonistas específicos sobre a fosforilação da proteína Tau em peixe zebra (*Danio rerio*)
- Avaliar o efeito do bloqueio de receptores adenosinérgicos do tipo A1 e A2a com antagonistas específicos sobre a fosforilação da proteína Tau em peixe zebra (*Danio rerio*)

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local de execução

Esse projeto será realizado no Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, terá duração de um ano e será submetido à análise pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais na PUCRS (CEUA/PUCRS), sendo executado mediante a sua aprovação.

### 4.2 Animais

Tendo em vista que a hiperfosforilação da Tau é uma das principais características da Doença de Alzheimer, serão utilizados peixe zebra transgênicos (ZFIN ID: ZDB-GENO-111028-2) usados no estudo de tauopatias, que possuem a proteína associada à FTD humana (demência frontotemporal), a hTAU-P301L, que induz a hiperfosforilação da Tau, em *Zebrafish*, em apenas 32 horas pós-fertilização (hpf) (39).

Para construção deste transgênico é utilizado um sistema bidirecional de expressão, o Gal4-UAS, no qual uma proteína fluorescente, a *DsRed*, é sempre expressa junto com a TAU-p301L, permitindo a identificação de células que expressam a Tau em embriões vivos por fluorescência *DsRed*. Os animais serão obtidos através do laboratório responsável pela criação dos transgênicos, o Schmid Lab.

### 4.3 Exposições a agonistas e antagonistas de receptores adenosinérgicos

Para induzir a ativação dos receptores adenosinérgicos, os animais serão divididos em dois grupos distintos, sendo eles: os tratados com CPA (um conhecido agonista de receptor A1) e os tratados com CGS21680 (um agonista específico de receptor A2a). Para bloquear a atividade dos receptores estudados, serão criados outros dois grupos que receberão como tratamento DPCPX (um antagonista específico de receptor A1) ou ZM241385 (um antagonista de receptor A2a). Para tratar os animais, as drogas serão adicionadas na água de



manutenção das larvas. Controles sem a adição de drogas serão realizados concomitantemente aos animais teste.

Os animais serão tratados do dia 3 pós-fertilização (dpf) até o 7dpf, período importante para a exposição às drogas visto que a eclosão já ocorreu e a barreira hematoencefálica encontra-se aberta. As concentrações das drogas serão selecionadas após realização de curvas de dose onde se observará a taxa de eclosão, mortalidade e a locomoção dos animais ao final do 7dpf.

#### *4.4 Western Blotting*

A fim de avaliar as alterações na fosforilação da proteína Tau pelo tratamento com agonistas e antagonistas adenosinérgicos, será utilizada a técnica de *Western Blotting*. Este procedimento, que inclui a utilização de anticorpos comerciais para quantificação do conteúdo proteico, permitirá não apenas a identificação da proteína de interesse, mas também das suas modificações pós-traducionais, utilizando-se anticorpos contra resíduos fosforilados. Ao completar 7dpf, os animais serão crióanestesiados utilizando imersão em gelo flocoado com água com parâmetros físico-químicos controlados e temperatura cerca de 2°C, eutanasiados por decapitação e o tecido nervoso será retirado sob estereomicroscópio, esta técnica já foi realizada efetivamente e é aceita como método para eutanásia (40,41). As amostras obtidas serão preservadas em solução resfriada com inibidores de protease e congeladas em freezer -80°C. As amostras serão processadas simultaneamente, submetidas à eletroforese SDS-PAGE, seguida de transferência para membranas de nitrocelulose. As membranas serão incubadas com anticorpos contra Tau (Invitrogen, 13-6400) e Tau-p (Thermo Scientific, MN1020 e MN1050), que serão visualizadas por quimioluminescência quando associados aos anticorpos secundários e à peroxidase (Sigma) e reveladas utilizando o Kit Western Lighting Western Blot Chemiluminescence (Perkin Elmer). A densitometria das bandas será feita utilizando o software ImageJ e os dados serão analisados através das comparações entre as médias por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido de testes *post hoc* para identificar os grupos que diferem.

## **5 RESULTADOS ESPERADOS**

Com a execução desse projeto pretende-se proporcionar conhecimento sobre como o sistema adenosinérgico pode interferir na fosforilação da Tau, para que a partir desse estudo seja possível propor novas drogas neuroprotetoras que atuem nesse sistema impedindo que essa proteína seja hiperfosforilada, evitando a formação dos emaranhados neurofibrilares.

## REFERÊNCIAS

1. Ferri C, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet*. 2005 Dec; 366(9503):2112-7
2. Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Wagner R, Ferri C. The global prevalence of dementia in 2010: a systematic review and meta-analysis. *Alzheimers Dement*. 2012 Jan; 9(1):63-75.
3. American Psychiatry Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 1994; 4.
4. Barnes D, Yaffe K. The project effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *The Lancet neurology*. 2011 Sep; 10(9):819-28.
5. Chew J, Silverman DHS. FDG-PET in Early AD Diagnosis. *Medical Clinics of North America*. 2013 May; 97(3): 485–494.
6. Pihlajamaki M, Sperling RA. fMRI: Use In Early Alzheimer's Disease And In Clinical Trials. *Future Neurology*. 2008; 3(4):409-21.
7. Kosik K. The molecular and cellular biology for tau. *Brain*. 1993 Jan; 3(1):39-43.
8. Cleveland D, Hoffman P. Neuronal and glial cytoskeletons. *Neurobiology*. 1991 Oct; 1(3):346-53.
9. Drechsel D, Hyman A, Cobb M, Kirschner M. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol. Biol. Cell*. 1992 Oct; 3(10): 1141–54.
10. Avila J, Lucas J, Perez M, Hernandez F. Role of Tau Protein in Both Physiological and Pathological Conditions. *Physiol Rev*. 2004 Apr; 84(2):361-84.
11. Golde T. Disease modifying therapy for AD? *Journal of Neurochemistry*. 2006 Nov; 99(3):689-707.
12. Skaper S. Alzheimer's Disease and Amyloid: Culprit or Coincidence? *International review os neurobiology*. 2012; 102:277-316.
13. Roberson E, Levie K, Palop J, Yan F, Cheng I, Wu T, et al. Reducing Endogenous Tau Ameliorates Amyloid b–Induced Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Science*. 2007 May; 316(5825):750-4.
14. Cunha R. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. *Neurochem. Int*. 2001a Feb; 38(2):107-25.
15. Cunha RA. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2A. *Purinergic Signaling*. 2005 June; 1(2): 111–134.

16. Zimmermann H. Ecto-nucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug. Dev. Res.* 2001 May; 52:44-56.
17. Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 1972; 24: 509-581.
18. Dunwiddie T, Masino S. Modern management of epilepsy: a practical approach. *Epilepsy Behav.* 2008 May; 12(4):501-39.
19. Fredholm B, Ijzerman A, Jacobson K, Klotz K, Linden J. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol. Rev.* 2001 Mar; 55: 527-52.
20. Ribeiro J, Sebastião A, de Mendonça A. Adenosine receptors in the nervous system: pathophysiological implications. *Prog. Neurobiol.* 2003 Dec; 68(6):377-92.
21. Swanson T, Drazba J, Rivkees S. Adenosine A1 receptors are located predominantly on axons in the rat hippocampal formation. *J. Comp. Neurobiol.* 1995 Dec; 363(4):517-31.
22. Rebola N, Coelho J, Costenla A, Lopes L, Parada A, Oliveira C, et al. Decrease of adenosine A1 receptor density and of adenosine neuromodulation in the hippocampus of kindled rats. *Eur. J. Neurosci.* 2003 Aug; 18(4):820-8.
23. Ongini E, Fredholm B. Pharmacology of adenosine A2A receptors. *Trends. Pharmacol. Sci.* 1996 Oct; 17(10):364-72.
24. Correia-de-Sá P, Ribeiro J. Evidence that the presynaptic A2A-adenosine receptor of the rat motor nerve endings is positively coupled to adenylate cyclase. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1994 Nov; 350(5):514-22.
25. Latini S, Pazzagli M, Pepeu G, Pedata F. A2 adenosine receptors: their presence and neuromodulatory role in the central nervous system. *Gen. Pharmacol.* 1996 Sep; 27(6):925-33.
26. Kessey K, Mogul D. Adenosine A2 receptors modulate hippocampal synaptic transmission via a cyclic-AMP-dependent pathway. *Neurosci.* 1998 May; 84(1):59-69.
27. Cunha R, Correia-de-Sá P, Sebastião A, Ribeiro J. Preferential activation of excitatory adenosine receptors at hippocampal and neuromuscular synapses by adenosine formed from released adenine nucleotides. *Br. J. Pharmacol.* 1996 Sep; 119(2):253-60.
28. Ribeiro J, DeMendonça A, Correia-de-Sá P, Cunha R, Sebastião A. Purinoceptors and synaptic plasticity. *Drug Dev. Res.* 1996 Dec; 39:353-60.
29. Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behavior and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society.* 2008 Feb; 83(1):13-34.

30. Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol*. 2004 Oct; 4(5):504-12.
31. Levin E, Chen E. Nicotinic involvement in memory function in zebrafish. *Neurotoxicol Teratol*. 2004 Dec; 26(6):731-5.
32. Tsang M. Zebrafish: A Tool for Chemical Screens. *Birth Defects Research (Part C)*. 2010 Sep; 90(3):185-92.
33. Piato A, Capiotti K, Tamborski A, Oses J, Barcellos L, Bogo M, et al. Unpredictable chronic stress model in Zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010 Mar; 35(2):561-7.
34. Egan R, Bergner C, Hart P, Cachat J, Canavello P, Elegante M, et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res*. 2009 Dec; 205(1): 38-44.
35. Stewart A, Wu N, Cachat J, Hart P, Gakwad S, Wong K, et al. Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011 Aug; 35(6):1421-31.
36. Sager J, Bai O, Burton E. Transgenic zebrafish models of neurodegenerative diseases. *Brain Struct Funct*. 2010 Mar; 214(2-3):285-302.
37. Boehmler W, Petko J, Woll M, Frey C, Thisse B, Thisse C, et al. Identification of zebrafish A2 adenosine receptors and expression in developing embryos. *Gene expression Paterns*. 2009 Mar; 9(3):144-51.
38. Bai Q, Burton E. Zebrafish models of tauopathy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011 Mar; 1812(3):353-63.
39. Paquet D, Bhat R, Sydow A, Mandelkow E, Berg S, Hellberg S, et al. A zebrafish model of tauopathy allows in vivo imaging of neuronal cell death and drug evaluation. *J. Clin. Invest*. 2009 May; 119(5): 1382–1395.
40. CCAC guidelines on the care and use of fish in research, teaching and testing. Ottawa: Canadian Council on Animal Care. 2005; 94p.
41. Wilson J, Bunte R, Carty A. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2009 Nov; 48(6):785-9.

## ANEXO 01 – CRONOGRAMA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Avaliação pelo Comitê de Ética	X	X										
Obtenção dos animais			X	X	X	X	X	X	X	X		
Curvas de dose			X	X	X							
Tratamento com CPA						X	X	X				
Tratamento com CGS21680						X	X	X				
Tratamento com DPCPX									X	X	X	
Tratamento com ZM241385									X	X	X	
Western Blot						X	X	X	X	X	X	
Análise estatística			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Preparo do manuscrito para publicação										X	X	X

## ANEXO 02 - ORÇAMENTO

Material de Consumo	Valor (R\$)
CPA	R\$ 260,00
ZM241385	R\$ 965,00
DPCPX	R\$ 173,00
CGS 21680	R\$ 1.670,00
Anticorpos primários e secundários para <i>Western Blotting</i>	R\$ 10.000,00
Reagentes para técnica de <i>Western Blotting</i> *	R\$ 4.500,00
Materiais plásticos (placas de 6 poços,ponteiras), Vidrarias, Luvas*	R\$ 1.000,00
<b>TOTAL</b>	R\$ 18.568,00

Material Permanente	Valor
Estufa BOD*	R\$ 4.000,00
Equipamentos de <i>Western Blotting</i> BioRad*	R\$ 7.000,00
Sistema de aquários em série*	R\$ 30.000,00
Computador para análise dos resultados*	R\$ 2.000,00
Software para análise dos dados*	R\$ 850,00
<b>TOTAL</b>	R\$ 43.850,00

\*Disponível no Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia da PUCRS