

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

Tâmie Duarte

**ANÁLISE DO COMPORTAMENTO TIPO AGRESSIVO EM
RESPOSTA À SUBSTÂNCIA DE ALARME EM DIFERENTES
LINHAGENS DE PEIXE ZEBRA**

Santa Maria, RS
2016

Tâmie Duarte

**ANÁLISE DO COMPORTAMENTO TIPO AGRESSIVO EM
RESPOSTA À SUBSTÂNCIA DE ALARME EM DIFERENTES
LINHAGENS DE PEIXE ZEBRA**

Trabalho de Conclusão de Curso, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Bacharel em Química**.

Orientador: Prof Dr. Denis Broock Rosemberg

Santa Maria, RS

2016

Tâmie Duarte

**ANÁLISE DO COMPORTAMENTO TIPO AGRESSIVO EM
RESPOSTA À SUBSTÂNCIA DE ALARME EM DIFERENTES
LINHAGENS DE PEIXE ZEBRA**

Trabalho de Conclusão de Curso, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Bacharel em Química**.

Aprovado em 01 de julho de 2016:

Denis Broock Rosemberg, Dr (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Hélio Gauze Bonacorso, Dr (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer à minha família e aos meus amigos, que estão sempre prontos para ajudar e torcem para que tudo dê certo. Ao meu irmãozinho, Davi, por colorir os dias cinzentos e pelo amor incondicional. Ao meu namorado Laércio, pela paciência em dias difíceis e por permanecer do meu lado independente de qualquer situação. À minha excelentíssima Bruna Fani, por ter crescido e evoluído junto comigo, e embora a vida tente nos derrubar sempre temos uma a outra para nos reerguer. Sem vocês nenhuma vitória faz sentido.

Quero também agradecer ao coordenador Valderi por resolver os problemas encontrados no meio do caminho, à todo grupo LaNE pelo companheirismo, união e auxílio mútuo tanto na vida quanto em laboratório, principalmente a Bárbara, ao Stênio e à Paola. Ao meu orientador Denis que se desdobra em infinitas funções e, mesmo assim, abdicou parte do seu tempo, inteligência e calma a quem começou. À Vanessa, que por todo o auxílio fez tornar este trabalho possível.

Dedicado à minha mãe Nelci, que trilhou meu caminho até aqui, sempre me dando força e incentivo. Também à minha querida e amada vó Maria, que mesmo não estando mais nesse plano continua sendo a luz que me guia.

RESUMO

ANÁLISE DO COMPORTAMENTO TIPO AGRESSIVO EM RESPOSTA À SUBSTÂNCIA DE ALARME EM DIFERENTES LINHAGENS DE PEIXE ZEBRA

AUTORA: Tâmie Duarte

ORIENTADOR: Denis Broock Rosemberg

A substância de alarme é produzida por peixes e liberada em ataque predador, o que desencadeia respostas aversivas de medo ou agressão nos seus co-específicos. A agressividade, além de ser uma resposta adaptativa dos animais, está relacionada às desordens comportamentais dos seres humanos. Diversos estudos tem associado o neurotransmissor serotonina e a enzima monoamina oxidase (MAO) à agressividade. A fim de compreender melhor as bases biológicas de agressão e da substância de alarme, neste trabalho avaliou-se as alterações comportamentais agonísticas e neuroquímicas promovidas pela substância de alarme em diferentes linhagens de peixe zebra (*Danio rerio*), que utiliza o teste de agressividade induzida por espelho. Os resultados demonstraram que a modulação da MAOz na medida experimental aguda da substância de alarme é dependente da linhagem estudada.

Palavras-Chave: Substância de Alarme. Peixe zebra. Linhagens. Comportamento agressivo. Monoamina Oxidase.

ABSTRACT

ANALYSIS OF AGGRESSIVE-LIKE BEHAVIOR IN RESPONSE TO ALARM SUBSTANCE IN DIFFERENT ZEBRAFISH STRAINS

AUTHOR: Tâmie Duarte
ADVISOR: Denis Brook Rosemberg

The alarm substance is produced and released by fish in predator attack, triggering aversive responses of fear or aggression in their conspecifics. The aggressiveness, despite being an adaptive response of animal is related to behavioral disorders in humans. Several studies have associated the serotonin neurotransmitter and monoamine oxidase (MAO) enzyme to the aggressive behavior. In order to better understand the biological basis of aggression and alarm substance, in this study we evaluated the agonistic and neurochemical behavioral changes caused by the alarm substance in different zebrafish (*Danio rerio*) strains, using the mirror-induced aggression test (MIA). The results demonstrated that the zMAO modulation in the acute experimental measurement of alarm substance is dependent of WT and leo strains.

Keywords: Alarm Substance. Zebrafish. Strains. Aggressive Behavior. Monoamine Oxidase.

Sumário

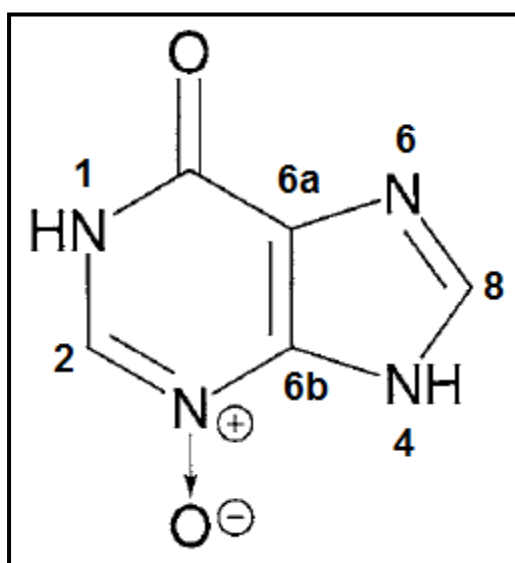
| | |
|---|-----|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 OBJETIVOS..... | 4 |
| 1.2 Objetivos Gerais..... | 4 |
| 1.3 Objetivos específicos..... | 4 |
| 2 MATERIAIS E MÉTODOS | 5 |
| 2.1 ANIMAIS..... | 6 |
| 2.2 Preparação da substância de alarme e exposição..... | 6 |
| 2.3 Equipamentos e procedimentos iniciais | 7 |
| 2.4 Teste de agressão induzida por espelho..... | 8 |
| 2.5 Ensaio da atividade catalítica da MAOz | 9 |
| 2.6 Análises estatísticas..... | 9 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 10 |
| 3.1 PARÂMETROS LOCOMOTORES | 10 |
| 3.2 Comportamento agressivo | 11 |
| 3.3 Atividade monoamina oxidase (MAOz) | 12 |
| 4 CONCLUSÃO | 154 |

1. INTRODUÇÃO

Algumas espécies de plantas e animais possuem a habilidade de liberar feromônios de alarme quando são mortos ou quando se encontram em uma situação de risco (BROILLET, 2009). Tais substâncias são moléculas voláteis que capacitam a sinalização de perigo para co-específicos, sendo amplamente utilizados por insetos e organismos aquáticos (VERHEGGEN, 2010). As reações observadas podem variar de acordo com a concentração do feromônio liberado (BROWN, 2004; GERLAI, 2008) ou com as espécies que as recebem (COOK, 2007; HUGUES, 2002; QUADROS, 2016).

A composição química dos feromônios de alarme é muito variável, o que pode ser simples ou misturas químicas complexas, cuja atividade é determinada pela sua composição específica, proporção quantitativa dos diferentes compostos e pelo estereoisomerismo das substâncias que predominam (BROWN, 2000). Até o momento uma das várias moléculas que possui ação de alarme em peixes teleósteos é a 3-N-óxido de hipoxantina (BROWN, 2004; PFEIFFER, 1985), a qual se encontra em grandes quantidades nas células da epiderme (BARBOSA, 2012), mostrada na Fig 1.

Fig. 1 – Estrutura da molécula 3-N-óxido de hipoxantina, caracterizada pela presença de anel purínico e um grupo funcional óxido de nitrogênio na posição 3.



Fonte: (BROWN, 2000 p 140) adaptado pelo autor.

Dados da literatura sugerem fortemente que o grupo funcional óxido de azoto da molécula 3-N-óxido de hipoxantina pode ser o responsável por desencadear as respostas moleculares induzidas pelo feromônio de alarme (BROWN, 2000). Esses achados constituem em evidências que sugerem a existência de um único composto de alerta comum a todas as espécies da superordem dos *Ostariophysí*, que inclui cerca de 55 famílias (MOYLE E CECH, 1988) e quase 72% de toda população de água doce (NELSON, 1984). Esta similaridade de reações intra e interespecíficas em peixes leva a crer em semelhanças nos mecanismos de sinalização química (BURNARD, 2008) e na conservação das respostas neurocomportamentais relacionadas aos fenótipos de comportamentos defensivos (VERHEGGEN, 2010).

Para que um determinado composto realmente atue como um feromônio de alarme, existem três critérios chave: Primeiramente, é preciso demonstrar a liberação do componente químico exclusivamente na presença da situação ameaçadora. Um segundo critério postula que o sinal seja percebido pelos indivíduos da mesma espécie e, por fim, que seja capaz de induzir comportamento semelhante ao observado quando os animais são expostos diretamente ao mesmo perigo. Esse último é geralmente o mais difícil, uma vez que não basta demonstrar uma alteração comportamental específica, mas caracterizar um conjunto de respostas frente à ameaça (WYATT, 2003).

Essas respostas podem ser classificadas como evasivas (como por exemplo, os animais receptores fugirem do liberador da substância de alarme) ou agressivas (animais receptores tendem a se mover para a fonte de emissão, bem como atacar ou assediar o predador) (VERHEGGEN, 2010). Em geral, a agressividade é um comportamento adaptativo importante que pode ser usado para otimizar a obtenção de recursos, tais como companheiros para acasalamento ou alimentos, adquirir e defender o território e estabelecer hierarquias dominantes em grupos sociais (KOOLHAAS e BOHUS, 1992). Em seres humanos, ela também é um sintoma de vários transtornos psiquiátricos, incluindo de déficit de atenção, hiperatividade e esquizofrenia (JONES e NORTON, 2015). No entanto, cada doença psiquiátrica pode estar relacionada com um diferente subtipo de agressão, complicando o desenvolvimento de terapias específicas. Por exemplo, o transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) é frequentemente associado com agressividade impulsiva ao invés de instrumental (VITIELLO e STOFF, 1997). Então, uma melhor compreensão acerca das bases neurobiológicas da agressão nestas doenças,

impulsionado por pesquisas em modelos animais pode ajudar a desenvolver melhores opções de tratamento para os pacientes (JONES e NORTON, 2015).

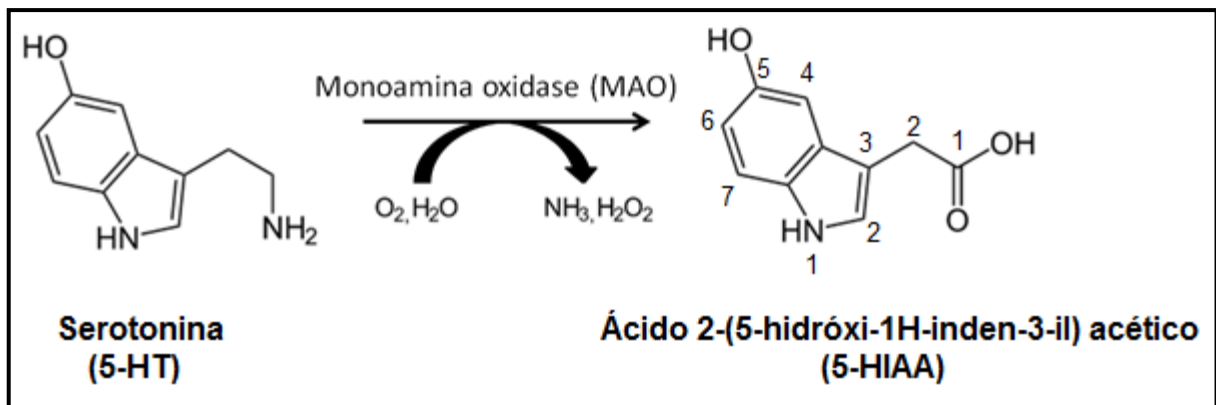
Um modelo que tem sido muito utilizado em estudos comportamentais e genéticos é o peixe zebra (*Danio rerio*). Essa espécie possui diversas vantagens em relação aos roedores, tais como a facilidade de manipulação, o alto rendimento em testes de triagens e o baixo custo para manutenção em laboratório (GERLAI, 2006; GOMEZ-MOLINA, 2015). Somados a estes aspectos, o peixe zebra é de simples manutenção em grupo, o estágio larval é transparente (KLEE, 2011) e a espécie apresenta um elevado grau de homologia genética e fisiológica em comparação aos seres humanos (KALUEFF, 2009), o que expressa todas as principais estruturas cerebrais, hormonais, de neurotransmissores e receptores (KALUEFF, 2014; KYZAR, 2012). Assim, as pesquisas que envolvem conhecimentos biológicos do peixe zebra proporcionam uma base sólida para sua utilização em estudos de comportamentos complexos, tais como a agressão (FILBY, 2010).

Em peixes, a agressividade pode ser examinada por diferentes metodologias. Dentre elas, a avaliação da interação agonística de dois peixes em um mesmo tanque pode ser empregada para observar o comportamento de defesa territorial (OLIVEIRA, 2011; TELES, 2013). Outro protocolo que pode ser utilizado é a análise da reação comportamental de um único peixe com relação a sua própria imagem no espelho (FONTANA, 2016; GERLAI, 2000). A primeira representa um cenário naturalista, em que todas as posturas agonísticas podem ser avaliadas (OLIVEIRA, 2011). Contudo, não existe um controle definido das variáveis que modulam tais respostas e os peixes podem sofrer algum tipo de lesão física, questionando a aceitabilidade ética do protocolo em questão (JONES e NORTON, 2015). Já na agressão induzida por espelho, apesar desta não recapitular todos os aspectos de uma interação agressiva com outro peixe, sem a indução de postura submissa, esses riscos de lesão não ocorrem, caracterizando um refinamento do protocolo experimental (OLIVEIRA, 2011; TELES, 2013). Contudo, por ser um método simples, de fácil padronização e não-invasivo, é mais aceitável em termos éticos (FONTANA, 2016).

A literatura mostra que diferentes linhagens do peixe zebra possuem comportamentos e respostas fisiológicas distintas (QUADROS, 2016; PAN 2012; WONG e GODWIN, 2015) que ainda não estão completamente compreendidas. Por outro lado, é documentado que a linhagens selvagem (*WT*) e leopardo (*leo*)

apresentam diferenças comportamentais robustas no comportamento do tipo ansiedade (EGAN, 2009; MAXIMINO, 2013) e quando expostos à substância de alarme em diferentes contextos, como a habituação à novidade no teste claro-escuro (QUADROS, 2016). Um estudo prévio mostra que a exposição aguda à substância de alarme aumenta a concentração extracelular de serotonina em torno de 80% (MAXIMINO e HERCULANO, 2014). A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) é um neurotransmissor do sistema monoaminérgico que apresenta um papel importante no sistema nervoso central como modulador da temperatura corporal, humor, sono, vômito e apetite, bem como da ira e da agressão (SIEGEL e VICTOROFF, 2009). Os níveis de serotonina podem ser regulados através da atividade da enzima monoamina oxidase (MAO), que provoca a desaminação do neurotransmissor (EDMONDSON 2011), como mostrado na Fig 2.

Fig 2 – Metabolismo de degradação da serotonina catalisado pela monoamina oxidase (MAO).



Fonte: do autor.

A enzima monoamina oxidase existe nas isoformas A e B (ARSLAN e EDMONDSON, 2010). As investigações sobre a estrutura e função de MAO-A e de MAO-B demonstram que as duas enzimas diferem na estrutura do sítio ativo (EDMONDSON, 2007; FILHO, 2008) e na ligação do inibidor (YOUJIM, 2006). A MAO-A se caracteriza por ter preferência pelo substrato 5-HT enquanto a MAO-B metaboliza preferencialmente o substrato feniletilamina (MAXIMINO e HERCULANO, 2014). No entanto, o peixe zebra possui apenas uma isoforma da MAO: a MAOz (ARSLAN e EDMONDSON, 2010; FIERRO, 2013). Análises farmacológicas e dados relativos à sequência de aminoácidos sugerem que a MAOz é mais semelhante à

MAO-A humana do que a MAO-B (EDMONDSON, 2011), o que explica os efeitos seletivos de inibidores da MAO nos níveis de serotonina (MAXIMINO, 2011). Embora resultados em modelos animais sugerirem que o papel da MAO-A na fisiopatologia da agressão baseia-se não apenas no sistema neurotransmissor da serotonina, como também da dopamina e do glutamato (GODAR, 2014).

Em roedores, a inibição da monoamina oxidase desencadeou respostas distintas em diferentes fases de crescimento: Nas três primeiras semanas de vida levou a um comportamento tipo ansiedade, enquanto nos estágios de adolescência e juvenil, provocou um comportamento tipo agressivo (YU, 2014) e na fase adulta verificou-se uma redução na agressão (GRIEBEL, 1998; DATLA, 1991).

Apesar das evidências apontarem para uma relação da agressividade com a MAO-A, muito pouco se sabe sobre as intervenções genéticas em indivíduos pré-dispostos. Há aqui o interesse de investigar alguns desafios não resolvidos relacionados com este comportamento, em conjunto com a avaliação do mecanismo de ação ainda desconhecido da substância de alarme. Para tanto, este trabalho submeteu duas linhagens de peixe zebra (com algumas características já bem definidas) à exposição aguda da substância de alarme, a fim de avaliar os parâmetros relacionados ao comportamento agonístico e a atividade da MAOz, possibilitando um maior desenvolvimento teórico para futuros estudos neurocomportamentais.

1.2 OBJETIVO

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar alterações comportamentais agonísticas e neuroquímicas promovidas pela substância de alarme em diferentes linhagens de peixe zebra.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a ação promovida pela substância de alarme em parâmetros locomotores e de motricidade;
- Analisar o padrão do comportamento agressivo;
- Quantificar a atividade enzimática da monoamina oxidase (MAO).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

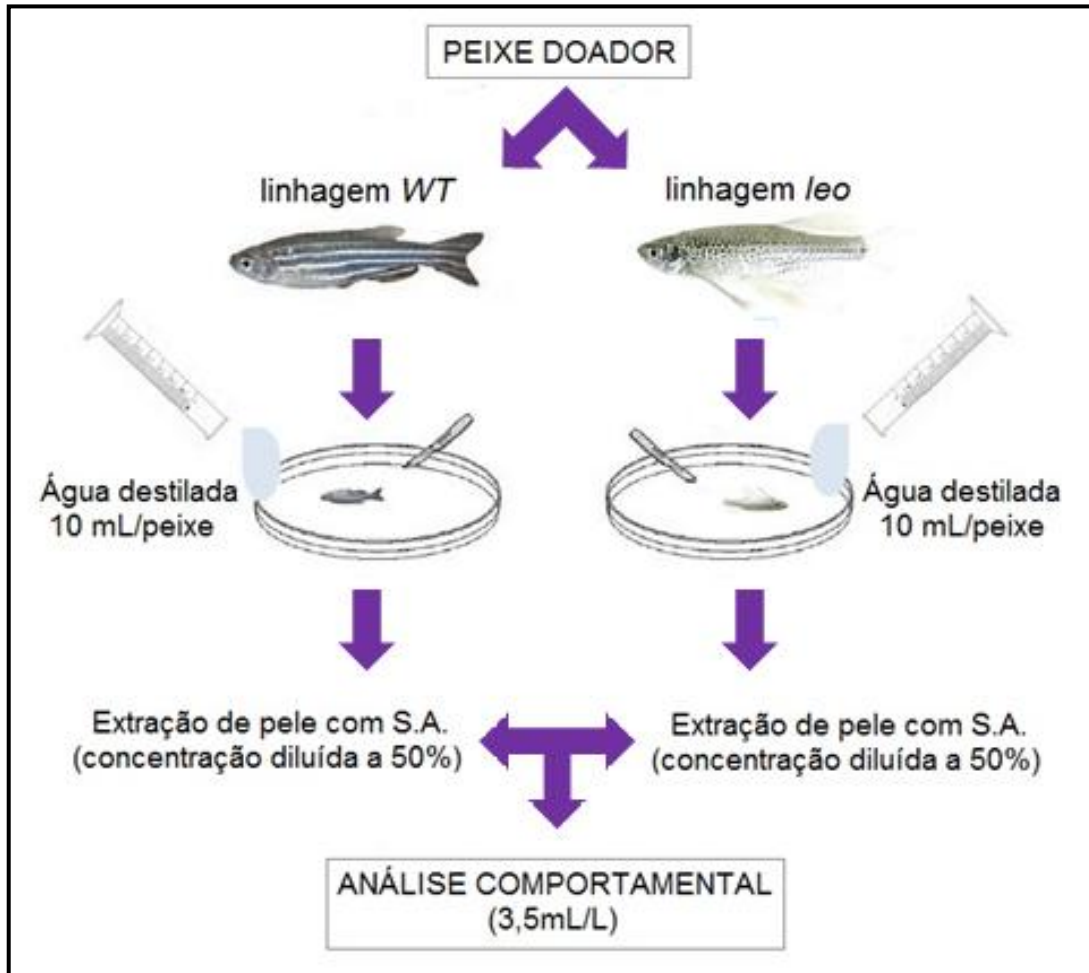
Para realização do estudo, peixes zebra (*Danio rerio*) adultos das linhagens selvagem (*WT*) e leopardo (*leo*) foram obtidos a partir do mesmo distribuidor comercial (Hobby Aquários, RS, Brasil). Os animais foram mantidos em aquários com capacidade de 40 litros, separados de acordo com seu padrão fenotípico de pigmentação em uma densidade máxima de quatro peixes por litro. Todos os tanques foram preenchidos com água dechlorada e os peixes foram alimentados 2x ao dia com ração comercial em flocos (Alcon Basic, Brasil). Os animais foram aclimatados por 14 dias em condições padrão de manutenção em laboratório (ciclo de luz ajustado para 14h no claro e 10h no escuro, com filtração mecânica e química da água e mantidos a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (106/2014).

2.2 Preparação da substância de alarme e exposição

A substância de alarme foi obtida a partir de um extrato da pele de peixes doadores da mesma espécie tal como descrito anteriormente (EGAN, 2009). Resumidamente, os peixes foram anestesiados em água a uma temperatura aproximada de 4°C e rapidamente eutanasiados por secção da medula espinhal. Fez-se a extração de células epidérmicas através de 10 a 15 cortes superficiais de ambos os lados do corpo do peixe com uma lâmina de bisturi. Os cortes foram cuidadosamente controlados para evitar que algum resquício de sangue contaminasse a solução. O corpo do animal foi lavado em uma placa de Petri com 10 mL de água destilada, agitado suavemente para cobrir integralmente cada porção lacerada, mantendo a solução em gelo. As amostras do extrato de pele foram posteriormente diluídas em 50% e a exposição à substância alarme foi realizada ao utilizar uma concentração de 3,5 mL/L durante 5 minutos. O grupo controle foi manipulado de maneira similar, porém tratado apenas água destilada. Tanto os animais dos fenótipos *WT* quanto *leo* foram expostos ao extrato obtido a partir da

pele obtidos de peixes doadores fenotipicamente semelhantes, como mostrado na Fig. 3.

Fig. 3 - Representação esquemática do protocolo experimental. A figura mostra o protocolo de extração da substância de alarme em peixes doadores das linhagens *WT* e *leo*.



Fonte: (QUADROS, 2016, p. 2) adaptado pelo autor.

2.3 Equipamentos e procedimentos iniciais

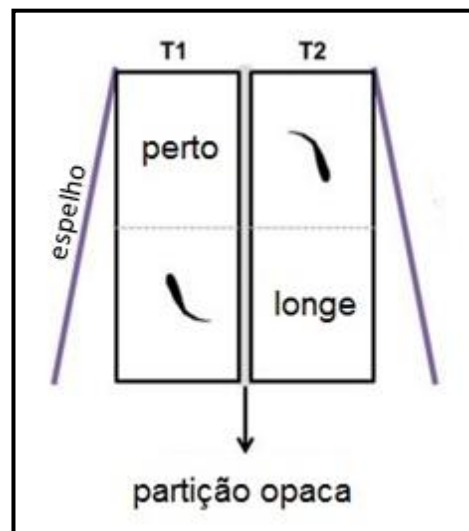
Todos os ensaios foram realizados no período entre as 10:00 e 16:00hrs. As atividades comportamentais dos peixes foram monitoradas e gravadas em uma sessão única de 6 minutos utilizando uma webcam conectada a um laptop com software apropriado (ANY-mazeTM, Stoelting CO, EUA) a uma taxa de 30 quadros/seg. Os equipamentos estavam alocados sobre uma superfície estável e os

procedimentos experimentais foram realizados em ambiente isolado para evitar o mínimo de interferentes.

2.4 Teste de agressão induzida por espelho

O protocolo do teste de agressividade induzida por espelho, do inglês “*mirror-induced aggression test*” (ou MIA) foi realizado conforme estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (Fontana et al, 2016), o qual foi baseado no protocolo descrito por Gerlai et al. (2000). Ao término da exposição, os peixes foram colocados individualmente no aparato de teste (25 cm de comprimento x 15 cm de altura x 6 cm de largura), com um espelho na parede de fundo inclinado a um ângulo de 22,5° de modo que a borda vertical esquerda do espelho tocasse no lado do tanque e a extremidade direita ficasse mais afastada. Os demais lados do tanque foram envolvidos com partições opacas, a fim de minimizar a distração e permitir a gravação simultânea do compartimento de dois animais. Os tanques foram virtualmente divididos em duas regiões (uma próxima e outra afastada do espelho) conforme esquema representado na Fig. 4.

Fig. 4 – Ilustração do modelo esquemático do aparato comportamental utilizado no teste de agressividade induzida por espelho. A figura mostra os espelhos inclinados (22,5°) e dois tanques divididos por uma partição opaca. As divisões virtuais nos tanques foram feitas para analisar o comportamento do peixe zebra, divididos em duas seções (perto e longe) representando a distância aparente à imagem oponente.



Fonte: (FONTANA, 2016, p. 20) adaptado pelo autor.

O comportamento agressivo foi analisado pelos seguintes parâmetros: número de episódios agressivos, duração dos episódios agressivos, a duração média de episódios agressivos e a latência para atacar o espelho. A agressão foi analisada manualmente por dois experimentadores treinados (confiabilidade entre avaliadores > 0,85). Os episódios agressivos foram computados quando os peixes apresentaram abertura de suas barbatanas, associada com movimentos de corpo ondulantes, nado rápido e mordidas em direção ao espelho em sua área mais próxima (seção perto) (Gerlai et al, 2000; Kalueff et al., 2013). O término da agressão foi determinado quando os animais pararam de investir contra a imagem do adversário. A fim de investigar as atividades motoras e de locomoção foram avaliadas a distância percorrida e velocidade angular utilizando análise automatizada pelo software (ANY-mazeTM, Stoelting CO, EUA).

2.5 Ensaio da atividade catalítica da MAOz

A preparação da amostra foi realizada utilizando um “*pool*” contendo dois encéfalos de peixe zebra em 500 µL de tampão de homogeneização, centrifugados a 3.000 rpm por 5 min. Foi retirado 100 µL do sobrenadante e adicionado com um ependorf já contendo 460 µL de tampão de ensaio e água destilada. A preparação foi posteriormente incubada a 37 °C por 5 min. Feito isso, adicionou-se 25 µL de substrato (quinuramina) e incubou-se por mais 30 minutos. A reação foi parada com 300 µL de TCA 10% e centrifugada a 4°C por 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e adicionou-se 1 mL de NaOH 1 M. A leitura no fluorímetro foi feita a 315 nm (excitação) e 380 nm (emissão).

2.6 Análises estatísticas

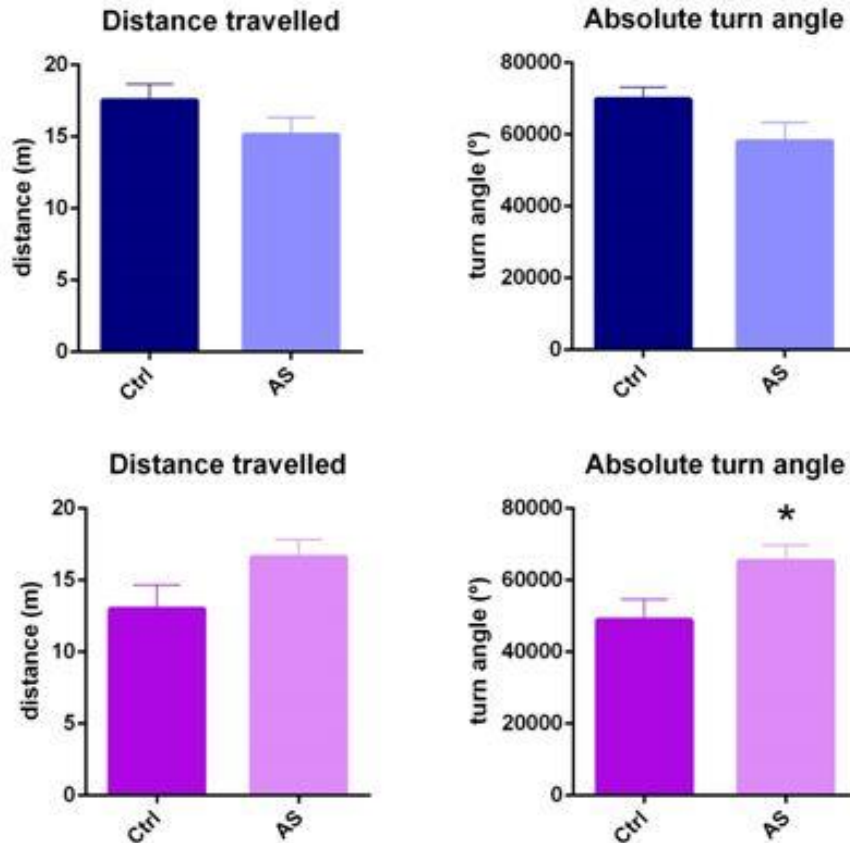
A normalidade dos dados foi analisada utilizando os testes de Kolmogorov-Smirnov e de Levene, respectivamente. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média e analisados através do teste *t* de Student bicaudal para amostras independentes. O nível de significância dos resultados adotado foi de 95%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 PARÂMETROS LOCOMOTORES

As ações da exposição aguda à substância de alarme de co-específicos estão mostrados na Fig. 5. Embora o grupo com a substância de alarme (SA) seja numericamente menor que o grupo controle da linhagem *WT* (em azul), essa comparação não foi estatisticamente significativa e, portanto, não houve alteração na locomoção e motricidade em peixe zebra da linhagem *WT*. No peixe da linhagem *leo* (em rosa) também não houve alteração na locomoção, mas os parâmetros motores foram afetados substância de alarme ($p < 0,05$). Tal fenômeno poderia estar associado a ocorrência de variações abruptas do sentido da direção de nado dos animais.

Fig 5 – Efeito da exposição aguda à substância de alarme nos parâmetros locomotores em co-específicos. Cores esquematizadas para linhagem *WT* em azul e *leo* em rosa. (Teste t de Student, $p < 0,05$, $n = 11$ por grupo).

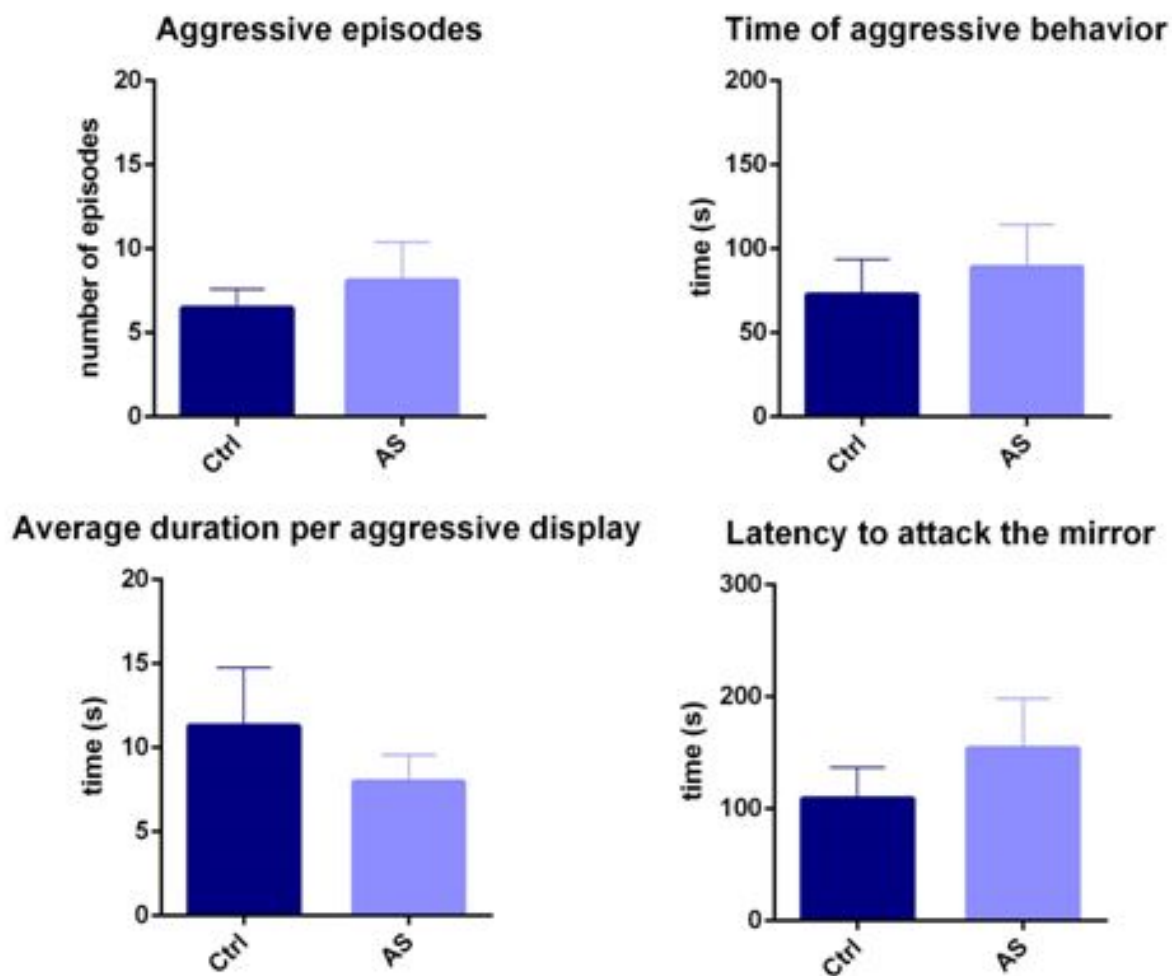


Fonte: do autor.

3.2 Comportamento agressivo

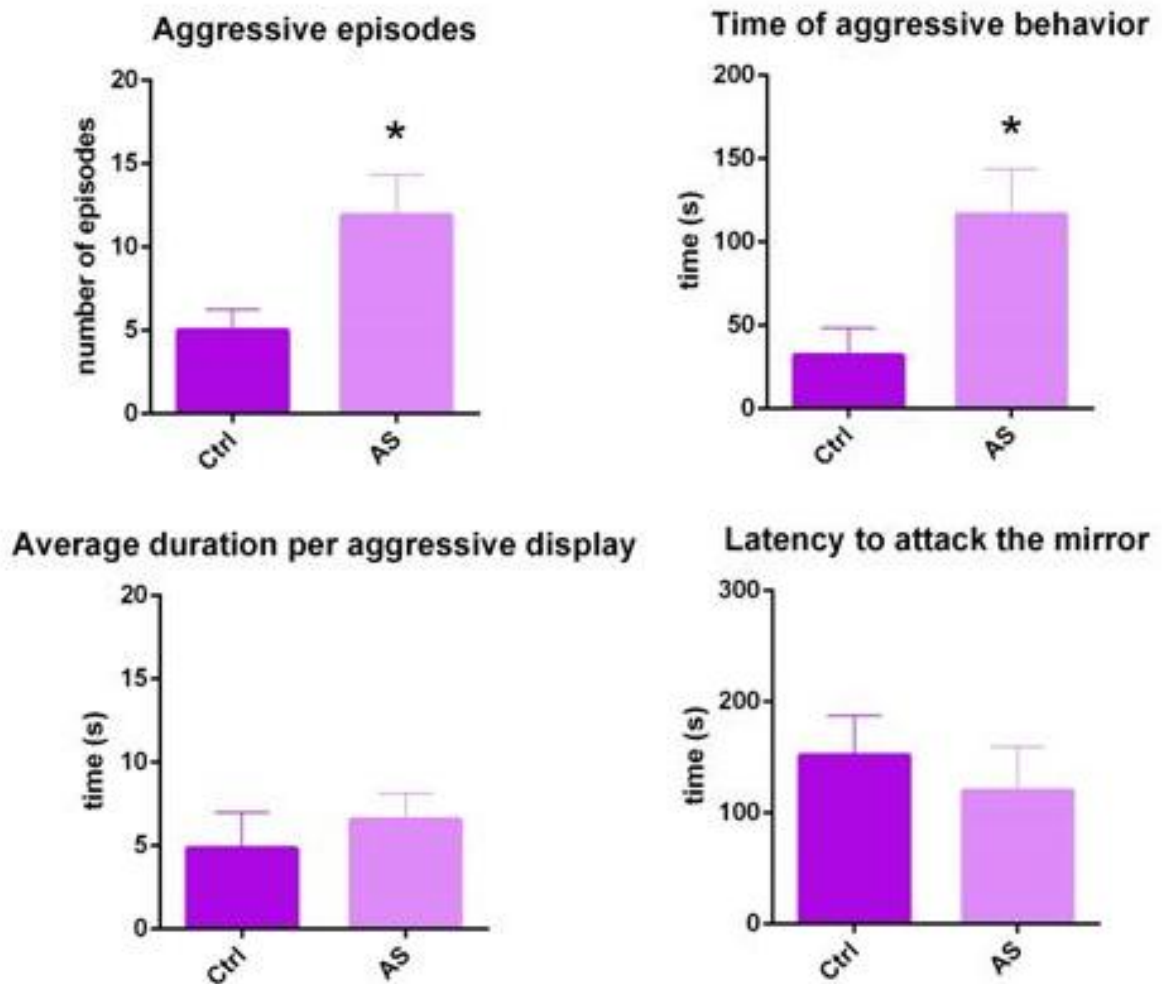
A exposição aguda à substância de alarme de co-específicos no teste MIA estão apresentados nas Fig. 6 e 7. Não houve alteração nos parâmetros relacionados ao comportamento agonístico em peixes *WT*, porém houve aumento no número de ataques ao espelho e no tempo de comportamento agressivo em *leo* ($p < 0,05$), o que sugere uma maior interação agonística do grupo tratado.

Fig. 6 - Efeito da exposição aguda à substância de alarme no comportamento agressivo em co-específicos da linhagem *WT* (Teste t de Student, $p < 0,05$, $n = 11$ por grupo).



Fonte: do autor.

Fig. 7 - Efeito da exposição aguda à substância de alarme no comportamento agressivo em co-específicos da linhagem *leo* (Teste t de Student, $p < 0,05$, $n = 11$ por grupo).

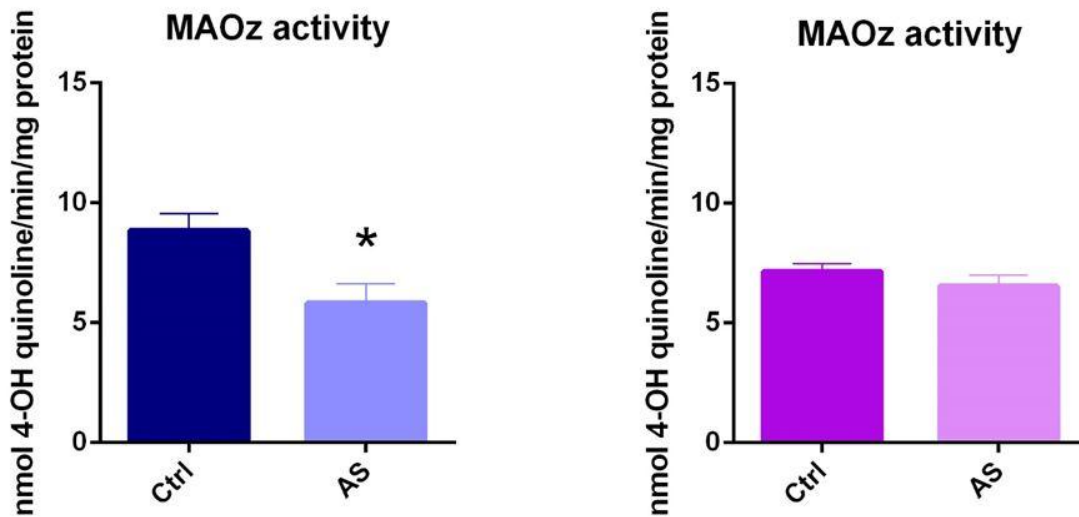


Fonte: do autor.

3.3 Atividade monoamina oxidase (MAOz)

A exposição aguda à substância de alarme de co-específicos do teste bioquímico da atividade enzimática da monoamina oxidase está representada na Fig 8. Curiosamente, a substância de alarme diminuiu a atividade da MAOz cerebral na linhagem WT ($p < 0,05$), o que pode ajudar a explicar o motivo pelo qual ele não apresentou um comportamento do tipo agressivo, uma vez que a diminuição da MAOz em ratos adultos está ligada a diminuição de agressividade. Em *leo* não houve alteração da atividade enzimática medida.

Fig. 8 - Efeito da exposição aguda à substância de alarme no teste bioquímico da MAOz em co-específicos. Cores esquematizadas para linhagem *WT* em azul e *leo* em rosa. (Teste t de Student, $p < 0,05$, $n = 4$ por grupo, onde cada n é constituído por um homogeneizado contendo 2 encéfalos de peixe zebra).



Fonte: do autor.

Possivelmente, a regulação enzimática que poderia influenciar os níveis de dopamina e serotonina ocorre de modo dependente de linhagem, sugerindo um papel da manutenção do "turnover" destes neurotransmissores em *leo* como um mecanismo que poderia estar envolvido com o comportamento agonístico medido.

4. CONCLUSÃO

Embora já se tenha alguma base sobre os efeitos da monoamina oxidase na agressão, neste trabalho nós analisamos que ela pode não estar ligada diretamente a este comportamento, uma vez que a linhagem *leo* se apresentou mais agressiva e não teve alteração nos níveis enzimáticos da MAOz.

As diferenças comportamentais e neuroquímicas identificadas entre *WT* e *leo* implicam que a substância de alarme atua de modo dependente de linhagem. Para elucidar este aspecto, o próximo passo será fazer exposição crônica da substância de alarme nessas duas estirpes de peixe zebra.

É interessante analisar que as diferenças entre *WT* e *leo* que vem sendo caracterizadas, corroboram para a uma escolha mais adequada de qual linhagem de peixe zebra utilizar conforme o teste comportamental proposto.

A fim de abordar melhor os desafios não resolvidos, futuros estudos com outros testes bioquímicos serão necessários. Além disso, seria interessante analisar se a substância de alarme e a agressão também são dependentes de gênero. Essas investigações são fundamentais para entender a base do mecanismo de ação da agressividade e deste modo possibilitar o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

REFERÊNCIAS

- ARSLAN, K. B.; EDMONDSON, E. D. Expression of zebrafish (*Danio rerio*) monoamine oxidase (MAO) in *Pichia pastoris*: Purification and comparison with human MAO A and MAO B. **Protein Expr. Purif.**, v. 70, p. 290-297, 2010.
- BARBOSA, Augusto et al. Behavioral characterization of the alarm reaction and anxiolytic-like effect of acute treatment with fluoxetine in piçáu fish. **Physiol. & Behav.**, v. 105, p. 784-790, 2012.
- BROILLET, M.; KLAEY, M.; BRECHBUHL, J. Grueneberg Ganglion Cells Mediate Alarm Pheromone Detection in Mice. **SCIENCE**, v 321, p. 1092-1095, 2009.
- BROWN, E. Grant et al. Ostariophysan Alarm Pheromones: Laboratory and Field Tests of the Functional Significance of Nitrogen Oxides. **J. Chemical Ecol.**, v. 26, n. 1, p. 139-154, 2000.
- BROWN, E. G.; POURIER, J.; ADRIAN, C. J. Assessment of local predation risk: the role of subthreshold concentrations of chemical alarm cues. **Behav. Ecology**, v. 15, p. 810-815, 2004.
- BURNARD, D.; GOZLAN, R. E.; GRIFFITHS, S. W. The role of pheromones in freshwater fishes. **J. Fish Biol.**, v. 73, p. 1-16, 2008.
- COOK, S. M; KHAN, Z. R.; PICKETT, J. A. The use of push-pull strategies in integrated pest management. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 52, p. 375-400, 2007.
- DATLA, K. P.; MITRA, S. K.; BHATTACHARYA, S. K. Serotonergic modulation of footshock induced aggression in paired rats. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 29, p. 631-635, 1991.
- EDMONDSON, E. D.; BINDA, C.; MATTEVI, A. Structural insights into the mechanism of amine oxidation by monoamine oxidases A and B. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 464, p. 269-276, 2007.
- EDMONDSON, E. D.; ARSLAN, K. B.; ALDECO, M. Catalytic and inhibitor binding properties of zebrafish monoamine oxidase (zMAO): Comparisons with human MAO A and MAO B. **Comparative Biochem. and Physiol.**, v. 159, p. 78-83, 2011.
- EGAN, J. Rupert et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behav. Brain Res.**, v. 205, p. 38-44, 2009.
- FILBY, A. L. et. al. Unravelling the neurophysiological basis of aggression in a fish model. **BMC Genomics**, v. 11, p. 498, 2010.
- FIERRO, A. et al. Similarities between the binding sites of monoamine oxidase (MAO) from different species-Is zebrafish a useful model for the discovery of novel MAO inhibitors? **An Integr View Mol Recognit Toxicology - From Anal Proced to Biomed Appl**, p. 405-431, 2013.
- FONTANA, D. Barbara et al. Modulatory of taurine on ethanol-induced aggressive behavior in zebrafish. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 141, p. 18-27, 2016.

- GERLAI, R. et al. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 67, p. 773-782, 2000.
- GERLAI, R. et al. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*). **Pharmac. Biochem. and Behav.** 85: 752–761, 2006.
- GERLAI, R.; SPEEDIE, N. Alarm Substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). **Behav. Brain Res.**, v.188, p. 168-177, 2007.
- GODAR, C. Sean et al. The aggression and behavioral abnormalities associated with monoamine oxidase A deficiency are rescued by acute inhibition of serotonin reuptake. **J. Psychiatr. Res.**, v. 56, p. 1-9, 2014.
- GOMEZ-MOLINA, C. et. al; Effects of selective $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor (nachr) ligands on the behaviour of adult zebrafish (*Danio rerio*) in the novel tank diving task. **Rev. Farmacol.** v. 8 p. 35-40, 2015.
- GRIEBEL, G. et al. Behavioral effects of phenelzine in an experimental model for screening anxiolytic and anti-panic drugs: correlation with changes in monoamine–oxidase activity and monoamine levels. **Neuropharmacology**, v. 37, p. 927-935, 1998.
- HUGHES, H. O. William et al. Field Evaluation of Potential of Alarm Pheromone Compounds to Enhance Baits for Control of Grass-Cutting Ants (*Hymenoptera: Formicidae*). **J. Econ. Entomol.**, v. 95, p. 537-543, 2002.
- JONES, J. L.; NORTON, H. J. W. Using zebrafish to uncover the genetic and neural basis of aggression, a frequent comorbid symptom of psychiatric disorders. **Behav. Brain Res.**, v. 276, p. 171-180, 2015.
- KALUEFF, V. A. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behav. Brain Res.**, v. 205, p. 38-44, 2009.
- KALUEFF, V. A. et al. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. **Trends Neurosci.**, v. 37, p. 264-278, 2014.
- KLEE, W. Eric et al. Zebrafish for the Study of the Biological Effects of Nicotine. **Nicotine & Tobacco Res.**, v. 13, n. 5, p. 301-312, 2011.
- KOOLHAS, M. J.; BOHUS, B. Animal models of Human Agression. **Animal Models in Psychiatry, II.**, v. 19, p. 249-271, 1992.
- KYZAR, E. J. et al. Effects of hallucinogenic agents mescaline and phencyclidine on zebrafish behavior and physiology. **Prog. Neuro-Psycophamac. & Biological Psychiatry**, v. 37, p. 194-202, 2012.
- MAXIMINO, Caio et al. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. **Prog. Neuro-Psycophamac. & Biological Psychiatry**, v. 35, p. 624-631, 2011.
- MAXIMINO, Caio et al. Behavioral and neurochemical changes in the zebrafish leopard strain. **Genes Brain Behav.**, v. 12, p. 576-582, 2013.
- MAXIMINO, C.; HERCULANO, M. A. Serotonergic modulation of zebrafish behavior: Towards a paradox progress. **Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry**, v. 55, p. 50-66, 2014.

MOYLE, P. B.; CECH, J.J. **Fishes: An Introduction to Ichthyology**, 2^a ed. Prentice Hall, Englewood Cleff, New Jersey, 1988.

NELSON, J. S. **Fishes of the World**, 2^a ed. Wiley-Interscience: New York, 1984.

OLIVEIRA, F. R.; SILVA, F. J.; SIMÕES, M. J. Fighting Zebrafish: Characterization of Aggressive Behavior and Winner-Loser Effects. **Zebrafish**, v. 8, p. 73-81, 2011.

PAN, Y.; CHATTERJEE, D.; GERLAI, R. Strain dependent gene expression and neurochemical levels in the brain of zebrafish: Focus on a few alcohol related targets. **Physiology & Behavior**, v. 107, p. 773-780, 2012.

PFEIFFER, W. et al. Effect of hypoxanthane-3(*N*)-oxide and hypoxanthine-1(*N*)-oxide on central nervous excitation of the black tetra *Gymnocorymbus ternetzi* (Characidae, Ostariophysi, Pisces) indicated by dorsal light response. **J. Chem. Ecol.**, V. 11, p. 507-523, 1985.

QUADROS, A. Vanessa et al. Strain- and context-dependent behavioural responses of acute alarm substance exposure in zebrafish. **Behavioural Processes**, v. 122 p. 1-11, 2016.

ROSEMBERG, B. Denis et al. Behavioral effects of taurine pretreatment in zebrafish acutely exposed to ethanol. **Neuropharmacology**, v. 63, p. 613-633, 2012.

SIEGEL, A.; VICTOROFF, J. Understanding human aggression: New insights from neuroscience. **Inter. J. Law and Psychiatry**, v. 32, p. 209-215, 2009.

TELES, C. M. et al. Social modulation of brain monoamine levels in zebrafish. **Behav. Brain Res.**, v. 253, p. 17-24, 2013.

VERHEGGEN, F. J.; HAUBRUGE, E.; MESCHER, M. C. Alarm Pheromones-Chemical signaling in response to danger. **Vitam. Horm.**, v. 83, p. 215-39, 2010.

VITIELLO, B.; STOFF, M. D. Subtypes of Aggression and Their Relevance to Child Psychiatry. **J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry**, v. 36, p. 307-315, 1997.

WONG, Y. R.; GODWIN, J. Neurotranscriptome profiles of multiple zebrafish strains. **Genomics Data**, v. 5, p. 206-209, 2015.

WYATT, T. D. Pheromones and Animal Behaviour. **The Press Syndicate of The University of Cambridge**, 2003.

YODIM, M. B. H.; EDMONDSON, D. E.; TIPTON, K. F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 7, p. 295-309, 2006.

YU, Qinghui et al. Dopamine and serotonin signaling during two sensitive developmental periods differentially impact adult aggressive and affective behaviors in mice. **Molecular Psychiatry**, v. 19, p. 688-698, 2014.