

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

Eneida de Oliveira Cabral Rocha

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE AS RESPOSTAS  
COMPORTAMENTAIS DE ALARME E REPRODUTIVA EM  
PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*).**

Porto Alegre, 2019

Eneida de Oliveira Cabral Rocha

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE AS RESPOSTAS  
COMPORTAMENTAIS DE ALARME E REPRODUTIVA EM  
PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Neurociências.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Denise Zancan

Porto Alegre, 2019

## Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer à CAPES e à UFRGS pelo financiamento do presente trabalho, ao laboratório de Neurobiologia Comparada e ao laboratório de Psicofarmacologia e Comportamento da UFRGS, pelo apoio e auxílio oferecidos pelos colegas que contribuíram direta ou indiretamente com a realização das etapas do estudo realizado. Gostaria também de estender o agradecimento a todos os professores do programa de Pós-Graduação em Neurociências que trabalham em prol do desenvolvimento de seus alunos e suas pesquisas, em especial à professora e orientadora Dr<sup>a</sup> Denise Zancan, que caminhou ao meu lado durante o mestrado, e cujo trabalho inspira, permite e incentiva a mim e a todos seus alunos e orientandos. Gostaria de agradecer também à equipe de servidores ligados ao programa, pelo empenho e dedicação. Meus agradecimentos também se dirigem à minha família, que é meu alicerce e meu norte na vida, e aos meus amigos, que são uma fonte luminosa de significado e beleza nos meus dias. Muito obrigada.

*Para Ariel.*

## Resumo

A habilidade de detectar estímulos do ambiente e responder apropriadamente é essencial para a sobrevivência dos organismos. Os comportamentos inatos evolutivamente conservados podem ser evocados por algumas classes de odorantes em *Danio rerio* (peixe-zebra), produzindo respostas estereotipadas adequadas. Entretanto, as respostas comportamentais inatas podem interagir entre si mediante situações de conflito, havendo priorização de uma em detrimento da outra. O presente trabalho objetiva investigar a relação entre comportamento reprodutivo e a resposta de alarme em peixe-zebra através da análise da influência do contexto reprodutivo sobre a resposta antipredatória. São exploradas as possíveis diferenças das respostas de alarme sob contexto reprodutivo, tanto em fêmeas quanto em machos, bem como a possível ocorrência de adaptação a diferentes concentrações de substância de alarme nos dois gêneros, quando aplicadas em concentrações crescentes sequenciais e concentrações únicas. Foi encontrada correlação inversa entre o tempo de corte e a resposta ao extrato de pele exposto de forma progressiva. Exposição aguda à uma concentração elevada de substância de alarme aumenta o comportamento de estresse agudo dos animais, de modo geral. Entretanto, as fêmeas são mais suscetíveis ao estresse quanto menor for o engajamento em comportamento reprodutivo. A resposta de alarme é embotada nos animais pelo contexto reprodutivo em concentrações baixas e concentrações médias da substância de alarme, tanto em exposições únicas quanto em exposições sequenciais. Os resultados indicam que a capacidade do contexto reprodutivo em modular a expressão de estresse agudo não é absoluta, e está sujeita a um limiar de resposta alto, pois em altas concentrações de substância de alarme os animais exibem comportamentos antipredatórios. Os dados contribuem para o cuidado experimental necessário nos experimentos com peixe-zebra, que envolvam análise dos comportamentos aversivos, de ansiedade e estresse, bem como de comportamentos reprodutivos, uma vez que os circuitos nervosos que determinam os comportamentos devem interagir entre si modulando-se mutuamente.

Palavras-chave: comportamento inato, comportamento reprodutivo, comportamento de alarme, interação, interferência, dimorfismo sexual, estresse.

## Abstract

The ability to detect stimuli from the environment and respond appropriately is essential for the survival of organisms. Evolutionary innate behaviors can be evoked by some odorants classes in *Danio rerio* (zebrafish), producing appropriate stereotyped responses. However, innate behavioral responses can interact with each other in conflict situations, with prioritization of one to the detriment of the other. The present work aims to investigate the relationship between reproductive behavior and the alarm response in zebrafish through the analysis of the influence of the reproductive context on the antipredatory response. Possible differences in alarm responses under reproductive context, both in females and males, as well as the possible occurrence of adaptation to different alarm substance concentrations in the two genders, when applied both in sequential increasing concentrations and single concentrations, are explored. An inverse correlation was found between courtship time and the response to the skin extract progressively exposed. High concentration single-exposure to alarm substance increases the animals acute stress behavior, in general. However, females are more susceptible to stress the lower the engagement in reproductive behavior. The alarm response is restricted in animals by the reproductive context at low concentrations and medium concentrations of the alarm substance, both in single exposures and in sequential exposures. The results indicate that the reproductive context's ability to modulate the acute stress expression is not absolute and is subject to a high response threshold because at high alarm substance concentrations the animals exhibit antipredatory behaviors. The data contribute to the experimental care required in zebrafish experiments, involving aversive behaviors, anxiety and stress, as well as reproductive behaviors analysis, since the nerve circuits that determine the behaviors must interact with each other by modulating mutually

**Keywords:** innate behavior, reproductive behavior, alarm behavior, interaction, modulation, interference, sexual dimorphism, stress.

## ÍNDICE

ABREVIACÕES .....	i
LISTA DE FIGURAS E TABELAS .....	ii
INTRODUÇÃO .....	11
O processamento olfatório em peixe-zebra .....	15
Áreas de processamento olfatório superior .....	17
Processamento olfatório e categorias comportamentais .....	19
Vias e modulações do comportamento reprodutivo e de alarme .....	20
OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICOS .....	24
MATERIAL E MÉTODOS .....	25
Animais experimentais .....	25
Grupos experimentais e procedimentos gerais .....	26
Extrato de pele e concentrações .....	27
Procedimentos - Contexto reprodutivo .....	27
Procedimentos - Protocolo de estresse agudo .....	30
Análise histológica das gônadas dos animais utilizados .....	35
Análise comportamental .....	36
Análise do comportamento de corte .....	38
Análise estatística .....	39
RESULTADOS .....	40
RESPOSTA DE ALARME EM PEIXE-ZEBRA MEDIANTE CONTEXTO REPRODUTIVO .....	40
Análise da correlação concentração-resposta entre grupos de concentração baixa, concentração média única e concentração alta única .....	40
Análise do grupo de concentrações baixas e progressivas .....	41
Análise dos grupos de concentração única .....	45

ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	51
Confirmação do gênero e do estágio reprodutivo dos animais utilizados .....	51
DISCUSSÃO .....	53
Análise das aplicações de concentrações progressivas .....	53
Análise das aplicações de concentrações únicas .....	57
CONCLUSÃO .....	60
PERSPECTIVAS .....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63
ANEXOS .....	72
Carta de Aprovação - CEUA .....	76

## ABREVIACÕES

AMPC: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico,

CB: cerebelo

CNG: canais de cálcio dependentes de nucleotídeos cíclicos, do inglês *Cyclic nucleotide-gated ion channel*

Dp: telencéfalo ou plio dorsal posterior, do inglês *Dorsal posterior palium*

Dm: telencéfalo ou plio dorsomedial, do inglês *Dorsal medial palium*

GMPC: Monofosfato cíclico de guanosina, do inglês *Guanosine monophosphate cyclic*

Hb: habênula

HT: hipotálamo

LOT: trato olfatório lateral, do inglês *lateral olfactory tract*

LMOT: trato olfatório médio-lateral, do inglês *lateral medial olfactory tract*

mMOT: trato olfatório médio-medial, do inglês *medial medial olfactory tract*

MLR: região locomotora mesencefálica, do inglês *mesencephalic locomotor region*

OECD: Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econmico, do inglês *Organization for Economic Cooperation and Development*

OB: bulbo olfatório, do inglês *olfactory bulb*

OE: epitelo olfatório, do inglês *olfactory epithelium*

ORNs: neurônios receptores olfatórios, do inglês *olfactory receptor neurons*

OT: tectum óptico, do inglês *optic tectum*

PAG: substância cinzenta periaquedutal, do inglês *periaqueductal gray*

PGF2a: prostaglandina F2a

PT: tubérculo posterior, do inglês *posterior tuberculum*

RST: trato reticulospinal, do inglês *reticulospinal tract*

SC: medula espinal, do inglês *spinal cord*

TE: telencéfalo

Vv: núcleo ventral do telencéfalo ventral

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1. Sumário das respostas de machos e fêmeas frente às diferentes circunstâncias experimentais realizadas no presente trabalho .....	50
Figura 1. Organização e caracterização dos neurônios sensoriais no epitélio olfatório de peixe-zebra .....	16
Figura 2. Desenho esquemático da organização do trato olfatório segregado em três categorias gerais sensíveis à estímulos químicos de naturezas diferentes .....	18
Figura 3. Representação geral de alvos centrais oriundos do epitélio olfatório .....	18
Figura 4. Esquema de contextualização das díades de animais em tanques-teste .....	28
Figura 5. Desenho ilustrativo do contexto experimental das díades e aplicação das diferentes concentrações de extrato de pele .....	29
Figura 6 (A-D). Desenho Experimental. Linha Do Tempo .....	31
Figura 7. Desenho esquemático representativo do plano meridional utilizado como parâmetro de avaliação da natação .....	37
Figura 8. Relação concentração-resposta para controles e testes quanto ao tempo de alarme mediante aplicação da concentração baixa, concentração média única e concentração alta única .....	41
Figura 9. Comparação entre controles e testes quanto ao tempo de alarme mediante aplicação de concentrações progressivas de substância de alarme .....	42
Figura 10. (A- C) Influência do tempo de corte no tempo de alarme nas concentrações sequenciais de substância de alarme .....	43
Figura 11. Diferença da resposta de alarme entre concentrações crescentes de substância de alarme em fêmeas e machos .....	45
Figura 12. Comparação da resposta de alarme mediante aplicação da concentração média única e alta única .....	45
Figura 13. Comparação entre respostas de alarme em concentrações médias únicas e progressivas de substância de alarme .....	46
Figura 14. Influência do tempo de corte na resposta de alarme de machos e fêmeas mediante aplicação de concentração única média de substância de alarme .....	46
Figura 15. Diferença entre respostas de alarme nas concentrações altas progressivas e únicas .....	47
Figura 16. Influência do tempo de corte no tempo de alarme para machos e fêmeas mediante aplicação da concentração alta única .....	47

Figura 17. Comparação entre controles e testes quanto ao tempo de alarme mediante aplicação da concentração média única e concentração alta única .....	40
Figura 18. Comparação entre respostas de alarme de machos e fêmeas testes em concentrações progressivas e únicas .....	49
Figura 19. Fotomicrografia de secções histológicas de gônadas de diferentes peixe-zebras <i>Danio rerio</i> adultos .....	52

## INTRODUÇÃO

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um peixe de água doce, nativo da região sudeste do Himalaia, pertencente à infraclasse Teleostei, da classe Actinopterygii, e à família dos ciprinídeos (Mayden et al, 2007). Característico zona tropical, seu ambiente natural são águas rasas, com grandes variações de temperatura (16 - 38°C), pH (5.9 - 8.5) e de baixa turbulência, onde o leito contém esparça cobertura de vegetação aquática (Spence et al., 2007). O peixe-zebra possui uma curta fase embrionária, com duração de 3 dias desde a fecundação do ovócito até a eclosão, e seu ciclo de vida se estende em média por 3 anos, atingindo maturidade sexual a partir de 90 dias após a eclosão (Westerfield, 2000). Trata-se de um animal de pequenas dimensões, com tamanho médio de 20 mm na idade adulta, exibindo o comportamento natural gregário, com formação de cardumes compostos de 5 a 20 indivíduos, e que possui dimorfismos sexuais e amplo repertório comportamental (Kimmel et al., 1995; Westerfield, 2000; Spence et al. 2007).

Comportamentos motivados e processos emocionais têm caráter adaptativo e são, portanto, evolutivamente conservados. Por mais que não haja uma definição de consenso para emoção que seja aceita em diversos campos, neurociências, psicologia e filosofia, propõe-se que a emoção consista de um estado interno que se estabelece no sistema nervoso central, desencadeado por estímulos específicos (extrínsecos ou intrínsecos ao organismo) (Anderson & Adolphs, 2014). Sob este ponto de vista adaptativo-evolutivo, o sistema nervoso central dos vertebrados pode ser considerado como um sistema modular, constituído de colunas de controle comportamental, das quais três sistemas descendentes controlam três comportamentos motivados fundamentais para a sobrevivência do indivíduo: o alimentar, o reprodutivo e os de defesa ou alarme (Swanson, 2000; Kelley, 2004).

O sistema olfatório é particularmente interessante para estudos comportamentais pois os estímulos químicos relevantes podem disparar diversos comportamentos básicos como reprodutivos e alimentares, além de respostas de medo e ansiedade. Desta forma, a avaliação de circuitos neuronais que abrangem este sistema configura uma maneira importante de estudar a formação e expressão das emoções (Kermen et al, 2013). O peixe-zebra ou *zebrafish*, tem sido muito utilizado em neurociências pela homologia fisiológica e genética com os mamíferos e pela facilidade de manipulação genética (Kalueff et al, 2013). O peixe-zebra também tem sido utilizado para identificar e caracterizar sistemas neurais evolutivamente conservados (Wullimann & Mueller, 2004; Mueller et al 2006; Mueller & Wullimann, 2009). Análises genéticas, desenvolvimentais e hodológicas estabeleceram várias homologias em estruturas

telencefálicas entre mamíferos e peixes actinoptérigeos (Bradford, 1995; Northcutt, 2006; Northcutt, 2008; Mueller et al, 2011).

Comportamentos como a resposta de medo, também chamados de comportamentos antipredatórios, foram descritos em *D. rerio* (Rehnberg & Smith, 1989; Speedie & Gerlai, 2008; Gerlai, 2010; Faustino et al, 2017). A resposta inata ao medo pode ser provocada nesta espécie pela detecção olfatória de substâncias liberadas pela pele, como indicativo de lesão (sinal de atividade predatória) de um coespecífico na vizinhança (Pfeiffer, 1977; Waldman, 1982). A identificação das áreas neuronais do bulbo olfatório envolvidas nesta resposta e a identificação das substâncias que atuam como feromônios de alarme também já foram estudadas (Jesuthasan & Mathuru, 2008; Mathuru et al, 2012; Hamdani & Døving, 2003). Algumas das áreas para as quais os neurônios do bulbo olfatório se projetam têm sido descritas com estudos de lesões de regiões telencefálicas no peixe dourado (Portavella et al, 2004), por métodos de traçamento de vias ou imuno-histoquímica de proto-oncogenes na carpa (Hamdani et al, 2000), no bagre (Nikonov et al, 2005), na truta (Folgueira et al, 2004) ou no próprio peixe-zebra (Turner et al 2016; Biechl et al 2017).

O destino das sinalizações olfatórias de *D. rerio* são bem conhecidas até o bulbo olfatório (Yaksi et al., 2007; Gayoso et al, 2011), e parte de suas projeções telencefálicas ou diencefálicas também são conhecidas (Miyasaka et al, 2009; Turner et al 2016; Biechl et al., 2017). Os neurônios sensoriais olfatórios fazem sinapse com células mitrais que formam dois tratos eferentes do bulbo olfatório: medial e lateral. A partir de trabalhos em algumas espécies de peixes, o feixe medial se projeta para o palio medial (Nikonov et al 2005), cuja região é considerada homóloga à amígdala de mamíferos (Bradford, 1995; Northcutt, 2006), enquanto que os axônios das células mitrais que se projetam pelo feixe lateral terminam principalmente no palio lateral, o qual é considerado homólogo ao córtex olfatório (Wullimann & Mueller, 2004; Mueller et al, 2011). Um número menor de axônios do feixe lateral alcança a habênula direita (De Carvalho et al., 2013).

Como os diferentes odorantes ativam diferentes circuitos telencefálicos que desencadeiam diferentes comportamentos, torna-se fundamental compreender a dinâmica existente na interação destas respostas inatas. Além do comportamento de alarme, estuda-se, o comportamento alimentar, que pode ser desencadeado pela ativação de receptores olfatórios, por meio de aminoácidos ou outras substâncias de valor apetitivo (Li et al., 2005; Tabor et al., 2004; Candelier et al, 2015). Também é alvo de investigações o comportamento reprodutivo em machos, que pode ser desencadeado por prostaglandina  $PGF2\alpha$  liberada pelas fêmeas após a ovulação (Weltzien et al, 2003; Yabuki et al, 2016). A maturidade sexual determina o marco do

desenvolvimento correspondente à fase adulta a partir de 90 dias após a eclosão (Kimmel et al, 1995).

Experimentos em carpa, *Carassius carassius*, demonstraram a ocorrência de situações-conflito, onde a resposta de alarme é suprimida no contexto comportamental reprodutivo (Lastein et al, 2008). Essa supressão da resposta de medo corresponde a uma priorização do comportamento reprodutivo, por ser um processo biológico essencial para os animais. Essa interação entre risco de predação e acasalamento gera um conflito entre maximizar a probabilidade do ritual de acasalamento resultar na desova e minimizar o risco de atrair predador, pois investir em amplos movimentos para o acasalamento é crucial para a receptividade, mas tornam os animais vulneráveis à sua detecção pelo predador (Magnhagen, 1991). A compreensão dessa tomada de decisão é alvo de muitos estudos com enfoque ecológico e evolutivo (revisão de Lima & Dill, 1990). Mas é igualmente importante conhecer como os circuitos neurais das respostas comportamentais básicas reprodutivas e de alarme podem estar relacionadas, como poderia ser inibida a resposta de alarme, um comportamento básico de sobrevivência, já bem descrito em peixes (revisão de Døving & Lastein, 2009).

Embora predominante, a priorização da reprodução em detrimento da fuga não é absoluta, pois alguns animais possuem estratégias comportamentais diferentes e sensibilidades diversas aos contextos ambientais (Lima & Dill 1990). Por ser uma espécie muito utilizada como modelo para estudos de comportamento, seria importante avaliar esta situação conflito em peixe-zebra, a fim de compreender até que ponto a reprodução poderia ser uma resposta prioritária para esta espécie. Além disso, as respostas a respeito das estratégias empregadas por estes animais pode lançar luz sobre as nuances da interação entre comportamentos adaptativos inatos. Estudos realizados na carpa *Carassius carassius* indicam que a prioridade reprodutiva ocorreria apenas em uma pequena janela de tempo, coincidindo com o período da desova (Lastein et al 2008), enquanto em *guppies*, o tempo dedicado ao acasalamento depende do nível de estresse do ambiente em que habitam (Godin & Digatkin 1996). Em peixe-zebra, porém, estas questões comportamentais continuam em aberto.

Segundo a análise desses estudos comportamentais de conflito, os comportamentos inatos poderiam, assim, ser moduláveis por outros comportamentos inatos, além dos processos naturais de aprendizado e adaptação (Bateson & Peter, 2011). Há ainda a discussão acerca da existência de organização hierárquica entre as respostas comportamentais diferentes para cada espécie animal (Baerends & Brauwer, 1955; Bateson & Peter, 2011). Ademais, o resultado comportamental frente a estímulos adequados pode depender do estímulo mais relevante, que

cooptaria o organismo para a expressão de um comportamento adaptativo para determinada situação (Tinbergen, 1951).

Em pesquisas de cunho neuroetológico, não está claro até que ponto certos contextos comportamentais podem coibir a expressão de outras ações dirigidas, ou até que ponto o organismo teria seus sistemas neuronais liberados para reagir a novos estímulos ambientais relevantes e concorrentes (Satterlie, 2013). É possível que não haja uma hierarquia comportamental propriamente dita, mas uma priorização da finalização de um comportamento, uma vez eliciado pelos indícios ambientais anteriores e atuais no qual o animal se encontra (Hein & Twomei, 2018), levando-se em consideração a redução de comportamentos aberrantes que poderiam ocorrer caso diferentes sinais antagônicos possuíssem a mesma relevância contextual.

Há evidências de que o contexto reprodutivo pode modificar as respostas de ansiedade em ratos, por exemplo. Quanto maior o tempo de exposição aos odorantes indicadores de estro feminino, menores são as respostas antipredatórias em ratos, provocadas por odorantes presentes em doninhas (Kavaliers et al, 2001). A substância utilizada neste estudo, a substância R2-propiltietano, é o principal componente secretado pela glândula anal destes animais (Crump, 1980), capaz de provocar respostas inatas antipredatórias em murinos. A diminuição da resposta antipredatória se correlaciona significativamente com o aumento dos níveis de testosterona nos machos testados, indicando possíveis níveis da neurocircuitaria onde haveria interação entre os dois sistemas comportamentais. Ademais, os níveis de analgesia em machos expostos aos odorantes femininos também influenciam significativamente o aumento da tolerância à dor, indicando um segundo nível de interação entre sistemas comportamentais adaptativos inatos (Kavaliers et al, 2001). Este é um exemplo para a importância do sistema olfatório nas respostas comportamentais, e sua modulação pelo status reprodutivo, em vertebrados de classes tão diversas quanto actinopterígeos e mamíferos.

A partir destes experimentos com roedores, os autores propõem a existência de uma modificação neuromodulatória de curto prazo, que favoreceria a redução de estresse, ansiedade e medo em animais, dependendo do contexto anterior de exposição a sinais ambientais de valores antagônicos. Estes estímulos ambientais atuam, então, como indutores do comportamento reprodutivo, através da elevação dos níveis séricos de esteróides neuroativos (Kavaliers et al, 1994; Compagnone & Mellon, 2000; Kavaliers et al, 2001), provocando a diminuição da ansiedade e promovendo a possibilidade de agressão entre os machos, sendo

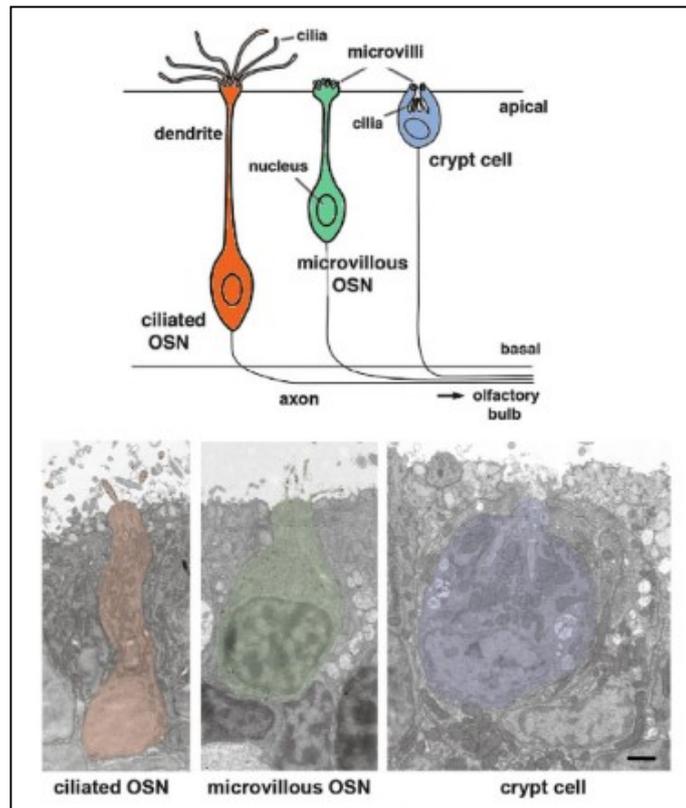
também um fator importante na redução de estresse frente a presença de predadores no ambiente.

Quanto aos estudos existentes explorando as respostas comportamentais reprodutivas e de alarme em peixe-zebra, sabe-se que feromônios como a prostaglandina  $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ) produzidos em estágios tardios do estro em fêmeas de peixe-zebra são odorantes bioativos mediadores do comportamento de corte em machos. Além disso, as vias de ativação derivadas deste estímulo olfatório já estão elucidadas (Yabuki et al, 2016). Quanto à neurobiologia da resposta de alarme, o glicosaminoglicano condroitina presente no extrato de pele evoca o alarme. Também já existem informações a cerca dos seus receptores sensoriais envolvidos na detecção deste estímulo, bem como as vias de projeção central e algumas das áreas do encéfalo envolvidas nesse sistema (Miyasaka, 2009; Gayoso, 2011; De Carvalho, 2013). Entretanto, apesar do crescimento das informações acerca destes aspectos, ainda existe uma lacuna no conhecimento da área a respeito da interação entre os dois sistemas em peixe-zebra.

## O PROCESSAMENTO OLFATÓRIO EM PEIXE-ZEBRA

O processamento olfatório em peixe-zebra se inicia a partir da transdução de sinais químicos dissolvidos no ambiente aquoso pelos neurônios receptores olfatórios (ORNs) presentes no epitélio olfatório, na cavidade nasal anterior do animal (Hansen & Zielinski, 2005). A cavidade posterior está conectada com a anterior, formando uma estrutura em sifão pela qual o líquido circundante flui unidirecionalmente (Weth et al, 2014).

Os ORNs se organizam em rosetas, de modo que os diferentes tipos celulares configuram camadas multilamelares distintas funcional e morfológicamente. Existem três tipos de neurônios sensoriais olfatórios em peixe-zebra: células ciliadas, com o corpo celular situado mais profundamente no epitélio; células com microvilosidades, localizadas em profundidade média; e células em “cripta” (*crypt cells*), mais superficiais, encontradas apenas em peixes e não em outros vertebrados (Hansen & Zielinski, 2005) (Figura 1).



**Figura 1.** Organização e caracterização dos neurônios sensoriais no epitélio olfatório de peixe-zebra. Observa-se a distinção morfofocelar e a diferenciação da localização de acordo com a profundidade de inserção no epitélio do órgão olfatório. (OSN: olfactory sensory neuron). Fonte: Mori, 2014.

Estes neurônios, segregados em diferentes camadas na estrutura em roseta do epitélio olfatório, enviam suas projeções que formam as fibras axonais do nervo olfatório também de modo segregado em direção ao bulbo olfatório (Sato et al, 2007). Assim, células ciliadas e com microvilosidades enviam projeções axonais para o bulbo olfatório dorsal e medial, enquanto células com cripta projetam-se para o bulbo olfatório lateral. Essas projeções dos ORNs alcançam as células mitrais do bulbo olfatório e o sinal é retransmitido também de modo segregado para áreas superiores do encéfalo (Sato et al, 2005, 2007). Cada tipo celular é especializado em detectar e transduzir categorias diferentes de sinais químicos.

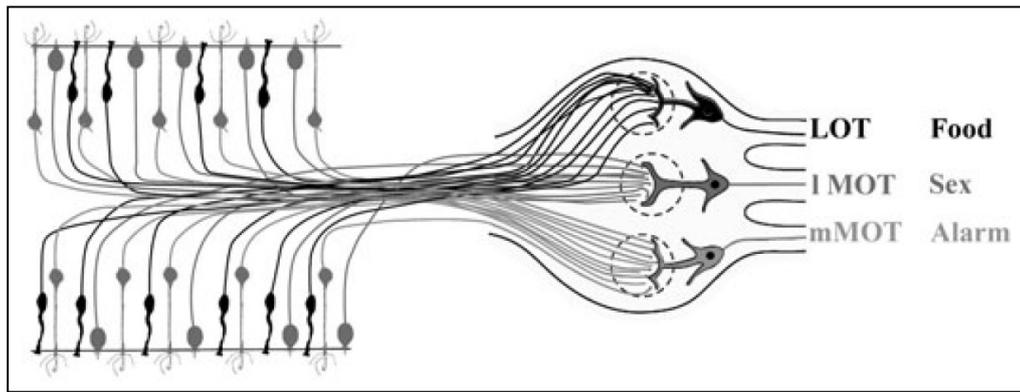
Desta forma, diferentes moléculas são preferencialmente detectadas por receptores com uma seletividade específica em cada neurônio e a informação é retransmitida de acordo com sua natureza, o que agrupa os próprios ORNs, feixes axonais e células mitrais do bulbo olfatório em categorias funcionais que são decodificadas separadamente em mapas quimiotópicos e sistemas comportamentais distintos, embora possa haver eventuais sobreposições em áreas telencefálicas superiores (Friedrich & Laurent, 2001, 2004).

## ÁREAS DE PROCESSAMENTO OLFATÓRIO SUPERIOR

Diferentes áreas do bulbo olfatório são responsivas a estímulos químicos de diferentes categorias em peixe-zebra. A área lateral do bulbo olfatório é responsiva a aminoácidos e nucleotídeos correspondendo ao comportamento alimentar (Koide et al, 2009); a área dorsomedial posterior e anterolateral é responsiva à extrato de pele, resultando em comportamentos de alarme (Mathuru et al, 2012); a área ventral do glomérulo do bulbo olfatório é responsiva a feromônios como prostaglandinas, correspondendo ao comportamento sexual (Friedrich & Korsching, 1998).

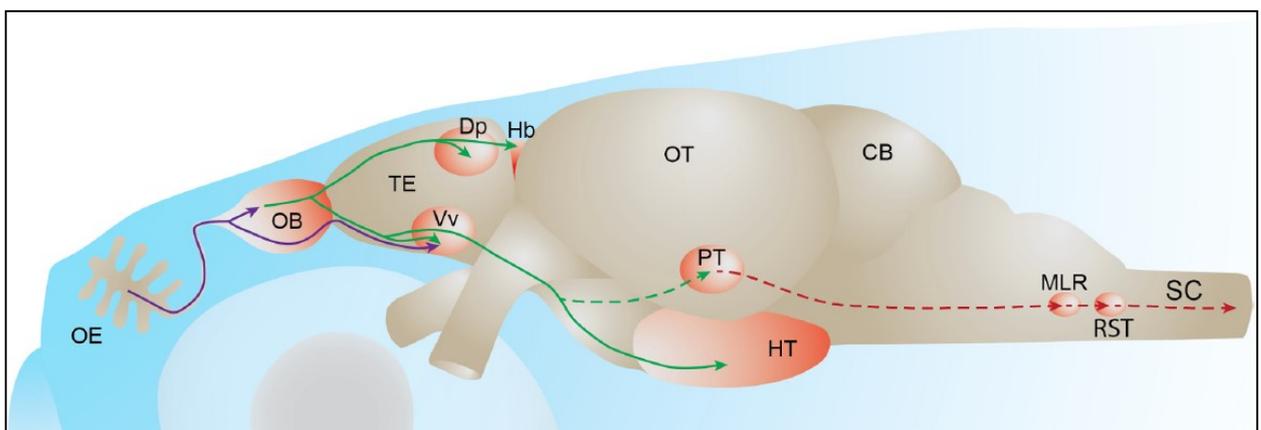
Sendo assim, os principais elementos discutidos no trabalho remetem às células ciliadas e às células com cripta. As células ciliadas se projetam para o bulbo olfatório dorsomedial e anterolateral e são os neurônios receptores responsáveis pela detecção dos estímulos olfatórios estressantes presentes no extrato de pele. Já as células com cripta que se projetam para o bulbo ventral são as mais responsivas aos estímulos químicos de esteróides e prostaglandinas, como o  $PGF2\alpha$ , responsáveis pela transmissão inicial de sinais comportamentais reprodutivos (Braubach et al, 2012).

A partir do bulbo olfatório, as vias ascendentes possuem diferentes alvos. Com base em vários estudos em *Carassius carassius* e *C. auratus*, foram descritas vias olfatórias segregadas com funções distintas. As células mitrais enviam projeções pelo trato olfatório medial e lateral. O trato olfatório lateral contém fibras que se originam do bulbo olfatório lateral, enquanto fibras que se originam do bulbo olfatório medial formam o trato medial (Sheldon, 1912). O trato olfatório medial, por sua vez, é subdividido em duas partes: lateral e medial. A porção lateral do trato medial se projeta para o próprio bulbo olfatório. Já a porção medial do trato medial, juntamente com o trato olfatório lateral se projetam para áreas telencefálicas e diencefálicas (Figura 2). A porção medial do trato medial também envia axônios para o bulbo olfatório contralateral (von Bartheld et al, 1984).



**Figura 2.** Desenho esquemático da organização do trato olfatório segregado em três categorias gerais sensíveis a estímulos químicos de naturezas diferentes. (LOT: lateral olfactory tract; lMOT: trato olfatório médio-lateral; mMOT: trato olfatório médio-medial). Fonte: Doving & Lastein, 2009.

Curiosamente, em experimentos realizados com *Gadus morhua* (bacalhau), a estimulação elétrica do trato medial é capaz de induzir dois tipos distintos de comportamentos adaptativos: o comportamento reprodutivo ou, por vezes, o comportamento de alarme. Diferentemente, a estimulação do trato lateral induz a comportamentos alimentares em salmões (Doving et al, 1980). Os alvos primários do trato olfatório de teleosteos são o núcleo ventral do telencéfalo ventral, no subpálio (Vv, homólogo à área septal de mamífero), o telencéfalo dorsal posterior, ou pálio dorsal posterior (Dp, homólogo ao córtex piriforme de mamífero), o telencéfalo ou pálio dorsomedial (Dm, região homóloga à amígdala basolateral dos mamíferos), a habênula direita e o hipotálamo lateral e caudal (Figura 3).



**Figura 3.** Representação geral de alguns alvos centrais oriundos do epitélio olfatório. (OE: epitélio olfatório, OB: bulbo olfatório, TE: telencéfalo, Dp: parte posterior dorsal do telencéfalo, Hb: habênula, Vv: núcleo ventral do telencéfalo ventral, OT: tectum óptico, PT: tubérculo posterior, HT: hipotálamo, CB: cerebelo, MLR: região locomotora mesencefálica; RST: trato reticulospinal, SC: medula espinal. Fonte: Kermen et al, 2013.

## PROCESSAMENTO OLFATÓRIO E CATEGORIAS COMPORTAMENTAIS

Ao contrário dos outros alvos dorsais do bulbo olfatório, o telencéfalo ventral (região Vv) apresenta considerável sobreposição de atividade frente a estímulos de categorias diversas. Já o telencéfalo dorsal (área Dp) responde mais especificamente a estímulos químicos, fazendo parte do processamento de especificação categórica dos odores (Kermen et al, 2013; Yaksi et al., 2009). A habênula em teleósteos têm sido considerada como homóloga a de mamíferos que participa no controle motor em comportamentos a partir de estímulos de diferentes valores emocionais, influenciando a atividade de neurônios do sistema dopaminérgico na área tegmentar ventral, ou de neurônios serotoninérgicos no núcleo da rafe (Tomizawa et al, 2001; Hikosaka, 2010). O hipotálamo dos teleósteos também é um outro alvo importante das projeções olfatórias, e permite a regulação de funções fisiológicas vitais presentes nos comportamentos de alimentação, reprodução e alarme. Os sinais olfatórios advindos do trato olfatório alcançam os núcleos caudal e lateral hipotalâmicos e, por vezes, podem se sobrepor (Machluf et al., 2011).

Quanto aos alvos superiores do bulbo olfatório participantes de funções comportamentais específicas como a reprodução e o estresse agudo (alarme), os seguintes cenários foram observados em diferentes estudos em peixe-zebra. No comportamento sexual, os sítios superiores ativados por PFG2 $\alpha$  compreendem o núcleo ventral do telencéfalo ventral (Vv), o núcleo pré-óptico parvocelular (pars anterior), o núcleo lateral do hipotálamo e a zona caudal do hipotálamo (Yabuki et al, 2016). Já no comportamento de alarme provocado pelo glicosaminoglicano condroitina, presente no extrato de pele, os sítios de ativação superiores são a habênula ventral, o griseum central, o palio dorsomedial, o núcleo da rafe e o hipotálamo (Miyasaka et al, 2009; Gayoso et al, 2011; De Carvalho et al, 2013). Desta forma, tendo em vista a convergência de projeções mediadas pelo sistema olfatório, percebe-se que as possíveis candidatas às áreas de modulação da via de alarme pela via reprodutiva podem ser três: o hipotálamo ventral, o palio dorsal e a habênula ventral.

Em relação às diferenças fisiológicas sofridas pelos animais durante o período de acasalamento, é importante salientar que o aumento de hormônios androgênicos como a testosterona nos machos reprodutivamente maduros possui efeitos tegumentares, diminuindo o número de células produtoras de muco (*clubcells* ou células clavadas) e, assim, diminuindo a produção de substância de alarme (Smith, 1973). A perda da resposta à substância de alarme associada à perda ou diminuição de células clavadas ocorre no período de acasalamento, quando os machos aumentam seus níveis de esteroides plasmáticos durante a maturação dos gametas e

fêmeas produzem hormônios estrogênicos e secretam feromônios como as prostaglandinas (Smith, 1973; Smith & Murphy 1974; Doving & Lastein, 2009).

Este efeito é bem relatado em espécies de teleósteos machos que apresentam comportamentos agressivos e competitivos frente ao contexto reprodutivo, como o peixe-zebra, apesar destes possuírem também outros comportamentos pró-sociais de formação de cardumes (Kalueff et al, 2013). A aproximação de outros machos normalmente configura situações de agressão por disputa da fêmea, com maior possibilidade de lesões superficiais entre estes, criando flutuações nas concentrações de condroitina liberadas de escamações das células produtoras desta substância de alarme (células clavadas) no ambiente aquático. Durante as investidas agressivas, os machos de peixes-zebra direcionam-se ao oponente, inclusive com mordidas, abrindo e fechando a boca repetidas vezes sobre a superfície corporal do outro indivíduo macho, geralmente em porções mais ventrais e posteriores do corpo (Oliveira et al, 2011).

Em diversas espécies de ciprinídeos como o peixe-zebra, há perda total de *clubcells* em machos e redução do número nas fêmeas (Smith, 1976). Estes dados gerais são importantes na apreciação dos resultados obtidos no presente trabalho porque através dos nossos experimentos, ficou demonstrada a presença de resposta de alarme, mesmo que diminuída, em contextos reprodutivos, ainda que não tenhamos realizado as análises histológicas da epiderme dos peixes utilizados para identificar a presença ou ausência de *clubcells*. Assim, mesmo que os animais possuam um recurso de variação fenotípica do tegumento para diminuir a resposta ao alarme durante o acasalamento, ainda permanece o controle central responsivo ao estímulo químico de alarme, mesmo que possivelmente com limiar mais elevado.

## VIAS E MODULAÇÕES DO COMPORTAMENTO REPRODUTIVO E DE ALARME

Durante a interação de corte, peixes ostariofisianos machos friccionam a área epidérmica dorsal contra a superfície de rochas e troncos onde é feita a oviposição (McMillan & Smith, 1974). Em contextos comportamentais naturais de agressão, é coerente que não apenas a produção, mas a sensibilidade à condroitina esteja diminuída em machos e fêmeas (Lastein et al, 2008). Assim, especialmente nestes peixes, dois comportamentos inatos estariam concorrendo com o comportamento de alarme, limitando-o: o reprodutivo e o agressivo, com possíveis interferências em níveis posteriores de processamento. Na fêmea, apenas um destes comportamentos concorre imediatamente com a expressão de estresse: o reprodutivo. Ademais,

de modo geral, a diminuição na presença de *club cells* epiteliais não justifica a resposta diferenciada de alarme em machos e fêmeas.

O processamento dos estímulos olfatórios relacionados à produção de estresse e respostas comportamentais de alarme associadas é bem explorado em modelos animais, entretanto, para as espécies de teleósteos geralmente empregadas em pesquisas, as informações ainda permanecem incompletas, embora tenhamos uma visão geral acerca da circuitaria subjacente (Jesuthasan, 2011). Em um nível primário, o processamento de estímulos se inicia no neurônio receptor e depende da transdução de sinais, onde a adaptação neuronal é um mecanismo fisiológico que ocorre repetidamente. Os neurônios centrais também possuem esta capacidade de diminuição ou alteração da taxa de disparos em circunstâncias de estímulo contínuo, e os neurônios que assim respondem o fazem de acordo com os canais iônicos fenotipicamente expressos (Luo Zheng et al, 2016). Na transdução olfativa, as substâncias odoríferas se ligam aos receptores que ativam uma proteína  $G_{olf}$ , estimulando então a produção de adenilato ciclase e formação de AMPc que acionam, por sua vez, canais catiônicos permitindo o influxo de sódio e cálcio. O cálcio então se liga também a canais de cloreto que contribuem para a despolarização do neurônio receptor (Touhara, 2002).

Pelo menos duas formas de adaptação rápida e outra persistente em neurônios receptores olfatórios coexistem em vertebrados e são coordenadas por mecanismos moleculares distintos. As evidências mostram a participação de canais de cálcio dependentes de nucleotídeos cíclicos (CNG), a modulação dependente de cálcio nestes canais CNG, a atenuação de adenilato ciclase pela cinase II dependente de cálcio e calmodulina, bem como a atividade do sistema de segundo mensageiro do GMP cíclico (Zufall & Leinders-Zufall, 2000). Caracteristicamente, a adaptação dos neurônios receptores ou dos neurônios centrais como as células estreladas e piramidais pode resultar em diminuição da taxa temporal de disparo ou produzir rajadas rítmicas de potenciais de ação seguidos de pausas, contribuindo para a alteração da percepção temporal e da intensidade dos odorantes presentes no ambiente (Touhara, 2002; Zufall & Leinders-Zufall, 2000).

Investigações realizadas em ratos utilizando técnicas de microscopia de dois fótons demonstraram que em altas concentrações de odorantes como aldeídos e ésteres as respostas pós-sinápticas sofrem rápida adaptação, com diminuição da liberação de glutamato pelos neurônios receptores nas células mitrais dos glomérulos. Assim, a adaptação estendida aos glomérulos e a subsequente modificação do padrão de disparos que chegam às células mitrais e são retransmitidas a centros superiores podem codificar também informações acerca da concentração dos odorantes (Lecoq et al., 2009).

Outros estudos trouxeram à tona evidências de que a atenuação da resposta neural à estímulos sustentados aumentam a detecção de novos estímulos transitórios, o que em contextos naturais corresponde à manutenção da prontidão para sinais de diferentes categorias. Neste sentido, também a desadaptação (ou retorno às condições normais) desempenha um importante papel, uma vez que o término da estimulação por um odorante precisa ser seguido de uma rápida recuperação da sensibilidade neuronal. A desadaptação categoriza um filtro temporal no retorno do neurônio sensorial para sua prontidão inicial. (Yoder et al., 2014). Desta forma, em situações experimentais onde os animais são expostos à odorantes em concentrações progressivas, podemos ponderar acerca da participação concomitante dos processos celulares citados acima.

A endocrinologia do desenvolvimento reprodutivo é melhor conhecida para o peixe-dourado, *Carassius auratus*. O momento de desova nas fêmeas é desencadeado pelo pico de hormônio luteinizante (LH), que ocorrerá quando os folículos estiverem na fase pós-vitelogênica (Kobayashi et al, 2002; Pankhurst, 2008). Em peixe-zebra o momento da desova também depende de condições ambientais favoráveis, como temperatura, fotoperíodo, nutrição e número de peixes no aquário (Laale, 1977). A dependência dos fatores ambientais pode servir para sincronizar a ovulação entre as fêmeas (Kobayashi et al, 1988). No momento da ovulação, a presença dos ovócitos no oviduto estimulam este a sintetizar prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ). A concentração de PGF2 $\alpha$  aumenta rapidamente na circulação e atua sobre o encéfalo, induzindo o comportamento sexual feminino e, ao ser liberada ao meio externo, funciona como um potente feromônio que dispara o comportamento de corte dos machos, induzindo, também, uma rápida resposta endócrina e testicular nos machos para realizarem a espermição (Kobayashi et al, 2002).

Em outros estudos endereçados à investigação da modulação de respostas inatas em mamíferos, vemos, por exemplo, que a expressão de comportamento defensivo em ratos expostos a gatos diminui, na maioria dos casos, lentamente de acordo com a repetição dos encontros. Entretanto, os níveis de corticosterona medidos neste estudo, mostrou-se 2 a 4 vezes maior do que nos animais controles. Porém, em um subgrupo, entretanto, ratos expostos não tiveram seus níveis séricos de corticosterona elevados, indicando a presença de variabilidades fenotípicas e neurofisiológicas em níveis individuais (Blanchard et al, 1998). Há, portanto, uma constante necessidade de avaliação das respostas inatas, a fim de observar a presença de plasticidades e apontar indícios das contribuições fisiológicas de natureza somática que interagem com a neurocircuitaria subjacente.

Sendo assim, fica evidente que mais de um fator, seja ele intrínseco ou extrínseco, pode participar do resultado comportamental de um animal, de forma que se torna necessário compreender a contribuição de cada elemento a fim de lidar com vieses presentes em estudos com modelos animais, ou a fim de compreender melhor a gênese e emergência de um comportamento em detrimento de outro, bem como compreender a expressão da variabilidade comportamental nos animais.

O presente trabalho tem como objetivo, portanto, expor os indivíduos ao contexto reprodutivo e, em seguida, a odorante que desencadeia a resposta de alarme. Assim, objetiva-se analisar a interação da resposta reprodutiva em *Danio rerio* com a resposta de alarme de machos e fêmeas desta espécie.

## OBJETIVO GERAL

Investigar a relação entre comportamento reprodutivo e de alarme em peixe-zebra.

### Objetivos Específicos

1) Analisar a resposta comportamental de casais de peixe-zebra ao feromônio de alarme mediante contexto reprodutivo para fêmeas e para machos a fim de estabelecer se há modificação da resposta de alarme

2) Analisar a resposta comportamental de casais de animais em contexto reprodutivo para verificar a ocorrência de respostas de estresse em aplicações únicas de substância de alarme sob diferentes concentrações.

3) Analisar na resposta comportamental de fêmeas e machos a possível ocorrência de adaptação a diferentes concentrações de substância de alarme, aplicadas em concentrações crescentes sequenciais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### ANIMAIS

Foram empregados 83 peixes-zebra adultos, com pelo menos 90 dias de idade, com dimensões corporais mínimas de 30 mm, machos e fêmeas (Westerfield, 2007). 80 animais foram utilizados nos testes e 3 animais foram utilizados como animais doadores para preparação do extrato de pele.

Os animais, geneticamente heterogêneos, foram adquiridos da distribuidora local Delphis Aquários Atacado e Varejo LTDA. Para garantir a aquisição de animais da mesma faixa etária, a qual foi garantida pelo fornecedor, foram utilizados animais de mesmo comprimento, uma vez que o tamanho corporal é o segundo parâmetro, ainda que não seja o critério determinante. Além disso, a maturidade sexual foi confirmada por histologia da gônada, de forma que os resultados apresentados são, de fato, de animais adultos da mesma fase reprodutiva. Os peixes foram transportados em sacolas plásticas e alojados no laboratório em aquários com dimensões de 40 cm x 22 cm x 18 cm, contendo água corrigida para os parâmetros fisiológicos de pH (7,0), amônia (0 ppm) e oxigenação (>4 ppm), através de kits de correção *Labcon Test*®. A temperatura da água foi mantida entre 27°C ± 1°C. Os animais foram mantidos em um ciclo de 14h claro:10h escuro e alimentados 3 vezes ao dia com ração *Tropical Tubivit e Biovit*®, com teores de proteínas adequados para peixes onívoros (Westerfield, 2000). Os animais foram mantidos nas condições citadas durante 10 dias antes do início dos testes. Após os experimentos, os animais foram crioanestesiados em água a 0°C, e após a verificação da parada dos movimentos operculares, eutanasiados por decapitação (Matthews & Varga, 2012). e submersos em solução de formol 10% por 24 horas, dissecados para retirada das gônadas, com subsequente desidratação e inclusão em parafina para obter as secções histológicas. Os testes comportamentais foram realizados diariamente, no turno da manhã, abarcando 4 díades em sequência, a cada dia.

Os experimentos respeitaram as resoluções normativas e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (CEUA/UFRGS), sob a identificação n°34542. Observa-se que, devido à indisponibilidade de novos cruzamentos de animais e subsequente fornecimento destes pelo Departamento de Bioquímica da UFRGS, no período de execução dos experimentos do presente trabalho, os mesmos foram adquiridos da distribuidora local Delphis Aquários Atacado e Varejo LTDA, citada acima.

## GRUPOS EXPERIMENTAIS E PROCEDIMENTOS GERAIS

No total, 80 animais foram testados aos pares, uma fêmea e um macho por teste. Os animais foram separados em 4 grupos experimentais descritos a seguir:

Grupo 1: Concentração baixa e posterior exposição a concentrações crescentes. (n=18)

Grupo 2: Controles. (n=18)

Grupo 3: Concentração única média (n=26)

Grupo 4: Concentração única alta (n=18)

O contexto dos testes, descritos a seguir, foram realizados de maneira idêntica para os quatro grupos, sendo os procedimentos divididos em duas etapas. Cada teste individual foi composto, em sua totalidade, de uma combinação de um protocolo reprodutivo para indução do comportamento de acasalamento (adaptado de procedimento descrito em Darrow & Harris, 2004), seguido de um protocolo de estresse agudo (conforme protocolo anteriormente descrito por Mathuru et al, 2012) e protocolo de preparação do extrato de pele utilizado por Speedie & Gerlai (2008), seguindo recomendações de Waldman (1982).

Os machos e fêmeas foram escolhidos conforme critérios morfológicos de dimorfismo descritos no item *Análise histológica das gônadas* e foram utilizadas fêmeas com indícios de protusão abdominal, como indicativos de *status* ovulatório. O sexo de cada animal foi confirmado posteriormente mediante análise histológica das gônadas.

Os pares foram filmados durante um tempo total de 60 minutos no Grupo 1 e no Grupo 2. Os 30 primeiros minutos corresponderam à interação dos animais. Os 10 minutos subsequentes corresponderam à aplicação do extrato e observação da resposta de alarme à concentração baixa de extrato de pele. Nos 10 minutos seguintes, houve a aplicação da concentração média e análise da resposta de alarme. Nos últimos 10 minutos, houve aplicação da concentração alta e análise da resposta de alarme. No grupo controle, foi repetida toda a sequência acima, porém com infusão de água (veículo) do tanque teste de cada diade.

Os experimentos com os grupos 3 e 4 foram filmados durante um tempo total de 40 minutos. Os 30 primeiros minutos foram correspondentes à interação e os últimos 10 minutos foram referentes à resposta às concentrações média e alta de extrato de pele. Figura 3 (A-D).

## EXTRATO DE PELE E CONCENTRAÇÕES

Para preparar o extrato de pele, três animais doadores foram utilizados (Waldman, 1982). Cada animal foi eutanasiado por imersão em água a 0°C. Em seguida, foram realizados 15 cortes superficiais em cada lado do animal, seguidos de lavagem com 1 mL de água destilada. O volume de água destilada utilizado para lavagem dos cortes correspondeu ao volume final de extrato bruto. Ao total, foram coletados 3 mL de extrato bruto, separados em alíquotas e congelados à -20°C (Speedie & Gerlai, 2008).

Ainda que o extrato não seja quantificado nas análises do presente trabalho, quanto à concentração final de condroitina presente nas soluções preparadas, é possível fazer uma estimativa, correlacionando os protocolos idênticos de extração da substância do epitélio às respostas animais (Speedie & Gerlai, 2008). Entretanto, devido à natureza experimental da análise comportamental, objetivando caracterizações não-farmacológicas e, portanto, sem fins de intervenção, as soluções com concentrações diferentes servem ao propósito investigativo de cunho etológico, inicial e básico. Trabalhos exploratórios dedicados à quantificação e caracterização da substância de alarme já foram realizados por Mathuru et al (2012), de modo que não foi objetivo do presente trabalho analisar a resposta a cada componentes e isoformas dos constituintes da substância de alarme, mas a interação da resposta aversiva completa (obtida com o extrato bruto) com a resposta de acasalamento.

A preparação dos extratos de pele foi realizada seguindo o protocolo de concentrações de Speedie & Gerlai (2008):

- (A) O extrato de alta concentração corresponde à 120 µL de extrato bruto/1,5L de água do tanque.
- (M) O extrato de média concentração corresponde à 50% da concentração alta, ou seja, 60 µL de extrato bruto/1,5L de água do tanque.
- (B) O extrato de baixa concentração corresponde à 10% da concentração alta, ou seja, 12 µL de extrato bruto/1,5L de água do tanque.

## PROCEDIMENTOS - CONTEXTO REPRODUTIVO

Em um primeiro momento, para cada teste, um macho e uma fêmea foram colocados simultaneamente em tanques-teste de vidro nas dimensões de 26 cm x 15 cm x 6 cm, contendo

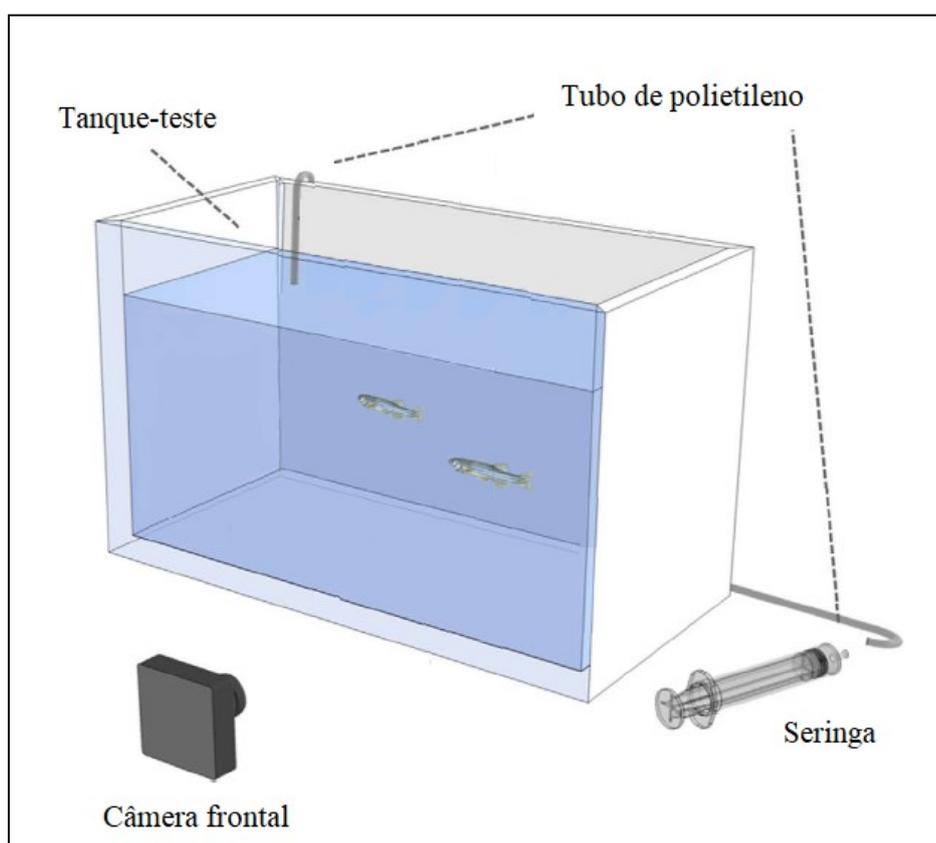
1,5 L de água tratada em parâmetros fisiológicos. No aquário também foram inseridas réplicas de plantas para um enriquecimento ambiental como incentivo situacional para a ovipostura, uma vez que a presença de elementos vegetais naturais ou simuláneos no fundo do aquário aumentam a incidência de sucesso reprodutivo em peixe-zebra (Darrow & Harris, 2004). Foram inseridos quatro simulacros vegetais à direita e quatro à esquerda, de dimensões iguais, medindo 3 cm cada, afixados com adesivo termoplástico composto de resina de E.V.A e resina taquificante, segura e atóxica. A temperatura da água foi mantida entre 26°C e 28°C, com o emprego de uma placa quente. O ciclo claro/escuro de 14h:10h foi mantido (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema de contextualização das díades de animais em tanques-teste, posicionados em isolamento pela barreira plástica permeável. Os animais foram mantidos *overnight* no protocolo reprodutivo sobre placa quente a fim de manter a temperatura estável entre 26°C e 28°C. Foram inseridas barreiras visuais entre um aquário e outro.

Uma barreira permeável de polietileno transparente foi colocada verticalmente em posição central no tanque a fim de separar fisicamente o macho e a fêmea, e a separação foi mantida *overnight* durante um período de 15 horas.

Após 15 horas de contextualização em contexto reprodutivo, o tanque-teste foi coberto em 3 das 4 faces (laterais e parte traseira) e ao fundo com lâminas emborrachadas de E.V.A pretas, a fim de bloquear a visualização do experimentador pelos animais, mantendo a passagem de luz. Em seguida, posicionou-se um tubo flexível de polietileno, medindo 10 cm de comprimento, na parede interna do quadrante superior esquerdo do tanque, acima do nível da água, e este tubo continha um conector para seringas de 3 mL, as quais foram subsequentemente utilizadas para administrar o veículo ou o extrato de pele na água (Figura 5). A parte superior foi coberta com papel branco a fim de prevenir o contato visual dos animais com o experimentador.



**Figura 5.** Desenho ilustrativo do contexto experimental das díades e aplicação das diferentes concentrações de extrato de pele. Fonte: Adaptado de Faustino, 2017.

Em frente ao tanque, a fim de evitar visualizações e reflexos, foi posicionado um aparato quadrangular forrado em fundo escuro, no qual foi posicionada, por sua vez, uma câmera (Samsung Note 8, com resolução de 640x480 pixels; VGA) com tripé, a fim de filmar o comportamento.

Após preparação do contexto, a barreira de polietileno foi removida e foi permitida a habituação dos animais durante 5 minutos. As filmagens do protocolo reprodutivo foram realizadas durante o tempo de 30 minutos, equivalente à interação reprodutiva dos animais. O tempo escolhido para interação dos animais foi baseado em Darrow & Harris (2004), onde estipula-se que em um período entre 10 e 30 minutos, a maioria significativa das díades exhibe todos os comportamentos estereotipados do comportamento de corte da espécie.

## PROCEDIMENTOS - PROTOCOLO DE ESTRESSE AGUDO

Após 30 minutos em contexto reprodutivo, foi administrada a substância de alarme no tanque-teste de cada díade. O número de concentrações e a quantidade de substância de alarme administrada variou de acordo com o grupo testado.

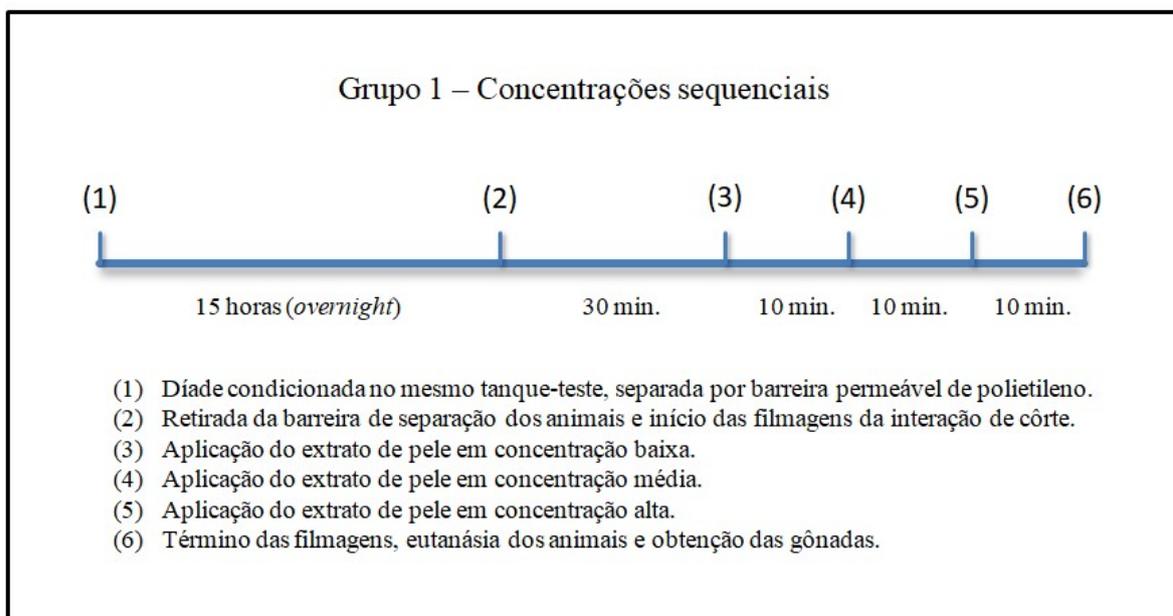
### Grupo 1: Animais submetidos a concentrações crescentes

No total, de 18 animais foram utilizados, agrupados em duplas de machos e fêmeas. Primeiramente, após 30 minutos de interação em contexto reprodutivo, foi administrada a concentração baixa de substância de alarme equivalente à 12 µL solubilizada em 488 µL de veículo, o qual corresponde à água tratada do próprio tanque-teste da díade, de modo que o volume total compreendesse um volume total de 500 µL a ser administrado.

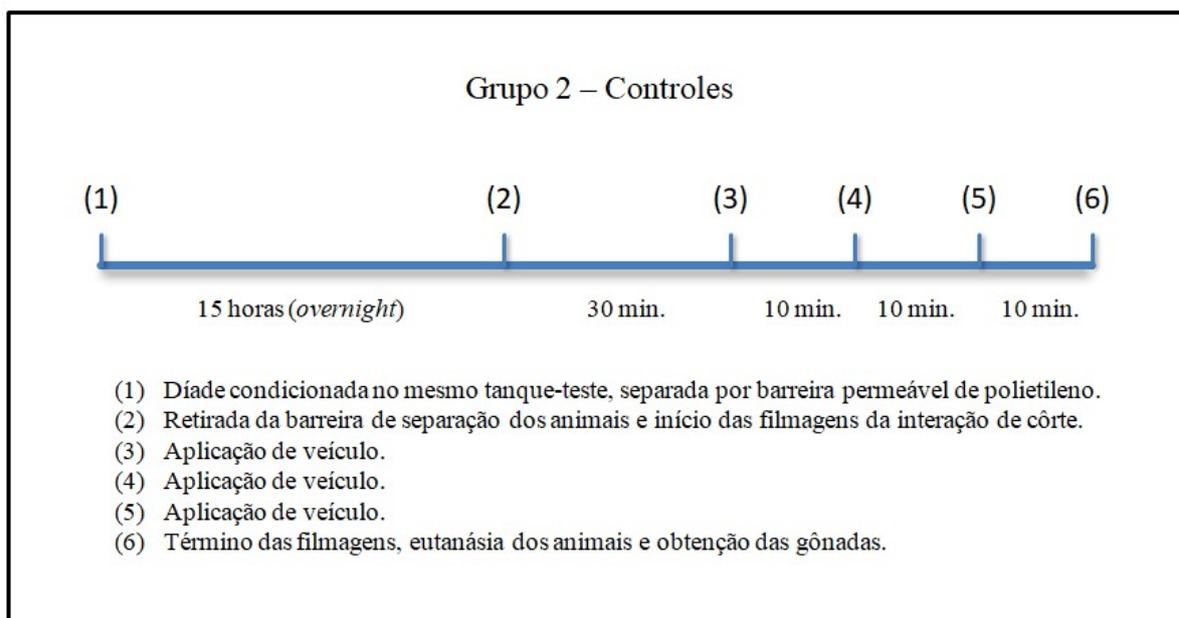
Três concentrações de substância de alarme em níveis crescentes foram administradas sequencialmente ao tanque-teste de cada díade a fim de observar a resposta e a presença ou ausência de adaptações. Cada concentração compreendeu um volume final de 500 µL. As concentrações de substância de alarme empregadas em cada concentração foram calculadas com base nos experimentos descritos por Speedie & Gerlai (2008). O desenho experimental está exemplificado conforme a Figura 6 (A-D).

## DESENHO EXPERIMENTAL - LINHA DO TEMPO

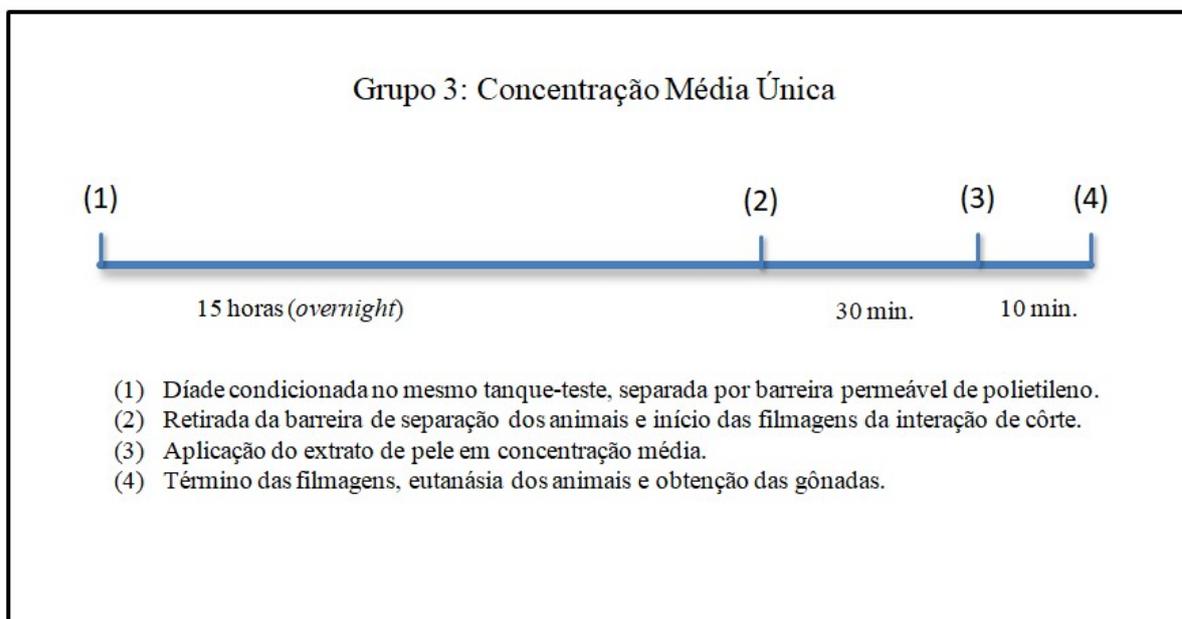
**Figura 6A.**



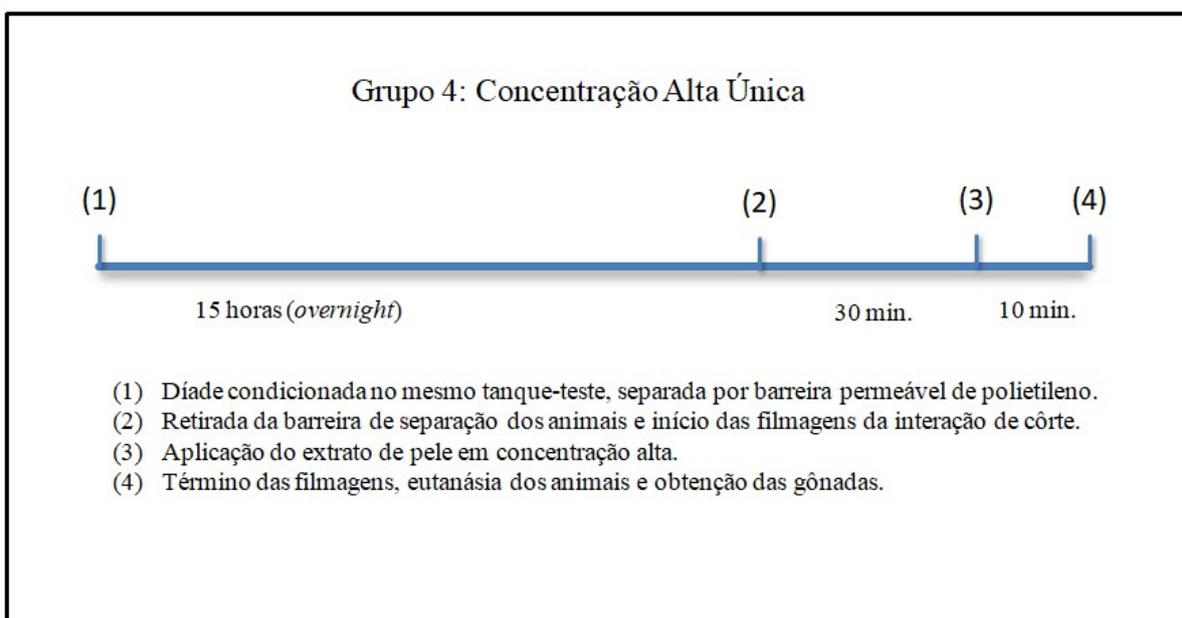
**Figura 6B.**



**Figura 6C.**



**Figura 6D.**



**Figura 6 (A-D).** Linha do tempo. Etapas experimentais realizadas em combinação dos protocolos reprodutivos e de estresse.

## ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO DE CONCENTRAÇÃO BAIXA

Para o extrato de concentração baixa, um volume de 12  $\mu\text{L}$  de substância de alarme bruta foi adicionado à 488  $\mu\text{L}$  de veículo, correspondente à água tratada retirada previamente do próprio tanque-teste de cada diade. A concentração de substância de alarme nesta etapa foi fixada em 12  $\mu\text{L}/1,5\text{ L}$ . O volume de 500  $\mu\text{L}$  de solução em concentração baixa foi então transferido para uma seringa de 3 mL acoplada ao tubo de polietileno e administrado lentamente a fim de não perturbar a superfície da água do tanque. A resposta de alarme foi registrada em vídeo durante o período de 10 minutos. Ao final deste período, foi aplicada a concentração média da substância de alarme.

## ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO DE CONCENTRAÇÃO MÉDIA

Para o extrato de concentração média, um volume de 48  $\mu\text{L}$  de substância de alarme bruta foi adicionado à 452  $\mu\text{L}$  de veículo. O volume de 500  $\mu\text{L}$  de solução em concentração média foi infundido no tanque-teste conforme descrito no parágrafo anterior. Ao adicionar nova solução com 48  $\mu\text{L}$  de substância de alarme bruto, obteve-se no tanque-teste uma concentração final de 60  $\mu\text{L}/1,5\text{ L}$  de substância de alarme, correspondente aos valores da concentração média. Após 10 minutos de registro da resposta, uma terceira infusão da solução de alarme foi administrada.

## ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO DE CONCENTRAÇÃO ALTA

Para o extrato de concentração alta, um volume de 60  $\mu\text{L}$  de substância de alarme bruta foi adicionado à 440  $\mu\text{L}$  de veículo, compondo 500  $\mu\text{L}$  de solução. A infusão do volume foi realizada conforme as etapas anteriores, de modo a não perturbar a superfície da água. A resposta de alarme foi registrada durante 10 minutos. Neste ponto, a última infusão elevou a concentração de substância de alarme à 120  $\mu\text{L}/1,5\text{ L}$ , correspondendo à concentração alta.

## GRUPO 2: CONTROLES

No grupo controle, um total de 18 animais foram utilizados, também agrupados e testados em duplas de machos e fêmeas, totalizando 9 casais. Primeiramente, os animais foram filmados por 30 minutos, durante a etapa de interação em contexto reprodutivo. Em seguida, foi administrado um volume de 500  $\mu\text{L}$  de veículo composto de água tratada do próprio tanque da diade testada. O veículo foi adicionado ao tanque-teste de modo idêntico à administração das concentrações de substância de alarme, sem perturbar a superfície da água. A resposta ao veículo foi filmada durante um período de 10 minutos. Após administração do primeiro volume,

uma nova infusão, também de 500 µL de veículo foi realizada e a resposta filmada durante os 10 minutos subsequentes. A seguir, o procedimento foi repetido por uma terceira vez, com a infusão de últimos 500 µL de veículo, compreendendo também mais 10 minutos de registro da resposta.

### GRUPO 3: CONCENTRAÇÃO MÉDIA ÚNICA

No grupo 3, 26 animais, machos e fêmeas, foram empregados, perfazendo um total de 13 casais. Conforme explicado anteriormente, as duplas foram submetidas primeiramente ao protocolo de contexto reprodutivo, sendo realizado, em seguida, o protocolo de estresse agudo. O comportamento de corte foi igualmente registrado durante um período de 30 minutos. Entretanto, houve apenas uma aplicação de substância de alarme, correspondente à concentração média utilizada anteriormente. O registro da resposta de alarme foi feito durante 10 minutos, somando, ao total, 40 minutos de observação para o grupo. A concentração final no tanque-teste respeitou os parâmetros anteriores de 60 µL/1,5 L, equivalente à concentração média. O volume de 60 µL de substância de alarme bruta, adicionado de 440 µL de veículo, compondo 500 µL de volume final, foi infundido aos tanques-testes de cada díade. A administração foi realizada lentamente a fim de não perturbar a superfície da água. A resposta de alarme foi filmada durante 10 minutos.

### GRUPO 4: CONCENTRAÇÃO ALTA ÚNICA

No grupo 4, 18 animais foram utilizados, machos e fêmeas, compondo 9 casais. De maneira idêntica aos demais grupos, o protocolo de contexto reprodutivo foi realizado primeiramente, e após este, o protocolo de estresse agudo foi empregado. O comportamento de corte foi filmado durante 30 minutos, após os quais, foi aplicada uma única de substância de alarme em concentração alta. O registro da resposta de alarme foi feito durante 10 minutos, somando, ao total, 40 minutos de observação para o grupo. A concentração final de substância de alarme fixou-se em 120 µL/1,5 L. Um volume de 120 µL de substância de alarme bruta, adicionado de 380 µL de veículo, contabilizado 500 µL totais, foi administrado ao tanque de cada díade testada. As condições dos testes mantiveram-se sempre idênticas. Após a infusão, o comportamento de alarme dos animais foi filmado durante 10 minutos.

## ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS GÔNADAS DOS ANIMAIS UTILIZADOS

Apesar da possibilidade de reconhecimento sexual de peixe-zebra pela visualização externa, em função do dimorfismo sexual, os animais foram dissecados após os testes experimentais para confirmar o gênero das díades de peixes, utilizados na análise dos comportamentos, e para analisar o estágio reprodutivo de cada espécime utilizado. O critério usado como dimorfismo em peixe-zebra é o formato do corpo e, para alguns autores, a coloração (OECD, 2010). O formato tem se mostrado um critério mais seguro para diferenciação do que a coloração, cujas variações não são consideradas marcantes (Spence et al 2008). Como as fêmeas adultas podem realizar postura de ovos em cativeiro a cada 5-10 dias, seu abdome é mais arredondado que o dos machos (Laale 1977; Conradsen & McGuigan, 2015), enquanto estes possuem nadadeiras anais maiores que as das fêmeas (Laale 1977; Spence et al 2008).

Após a crioanestesia e decapitação do animal utilizado nos testes, as gônadas, situadas lateroventralmente à bexiga natatória e rostral ao ânus, foram removidas sob microscópio cirúrgico, fixadas em formol 10% por 18 a 24h, desidratadas em série alcóolica, seguida de clorofórmio, antes da inclusão em parafina. As secções em micrótomo (Micron HM325) foram feitas a 10 µm e os cortes foram coletados em lâminas bigelatinizadas. Os cortes foram corados com a técnica hematoxilina-eosina e posteriormente desidratadas em série de álcoois de concentração crescente, seguida de xilol e montadas com lamínulas e bálsamo.

Foi realizada a análise histológica das gônadas para confirmar a fase do ciclo reprodutivo dos animais utilizados, para termos segurança de que a avaliação do comportamento de corte observado é reflexo da fase ovulatória das fêmeas e da liberação de espermatozoides nos ductos e assegurar correlacionações mais precisas entre a interferência da prontidão sexual com a resposta ao estresse.

Para a avaliação qualitativa do estado de maturação dos ovários, os cortes seriados das gônadas de cada animal foram analisados, buscando identificar a proporção em que apareciam as seguintes estruturas nos ovários: ovócitos primários (ou complexo folículo-ovócito de estágio I), folículos no estágio II ou alveolar-cortical, folículos ou ovócitos vitelogênicos, folículos ou ovócitos maduros, folículos atresícos e folículos pós-ovulatórios. Para a identificação e classificação dos estágios ovarianos para *Danio rerio* foram utilizadas como referência as descrições de Selman et al (1993) e do OECD (*Histopathology Guidance Document*, 2010).

Nos testículos foi avaliada, também qualitativamente, a presença de espermatozoides livres em relação às demais populações de espermátides, espermátócitos e espermátogônias que permanecem em cistos formados pelas células de Sertoli. Quanto maior a presença de cistos com espermátides avançadas, de espermatozoides liberados e menos espermátogônias, mais descontínuo aparecerá o epitélio dos cistos, cujo aspecto também é utilizado para determinar a maturidade do testículo (Grier 1981; Huszno & Klag 2012).

## ANÁLISE COMPORTAMENTAL

Após a realização dos testes comportamentais de corte e de alarme, foram analisadas as gravações de cada díade de animais em cada grupo experimental. As observações foram feitas para cada animal em separado, a partir da mesma filmagem da díade. Assim, cada fêmea e cada macho foram analisados e os comportamentos anotados, seguindo os mesmos parâmetros. As verificações compreenderam dois componentes: o comportamento de interesse e o período total de tempo que cada animal o realizou, contabilizado em segundos. Cada análise foi feita primeiramente para o padrão comportamental do macho, em seguida, para o padrão comportamental da fêmea tanto para o comportamento de corte quanto para o comportamento de alarme (Kalueff et al, 2013). No início de cada análise, cada animal foi individualmente identificado conforme indícios morfológicos de dimorfismo sexual, depois confirmado pela histologia das gônadas.

O padrão natatório foi discriminado entre lento e rápido, anotado conforme os seguintes parâmetros: para cada tanque-teste considerou-se uma linha meridiana medial dividindo o aquário em dois planos opostos equivalentes (Figura 7). Considerou-se como natação lenta todo padrão natatório onde o animal empreendeu 5 ou menos cruzamentos de um lado a outro, em relação ao plano meridional, em um tempo de 5 segundos ( $\leq 5 \text{cruzamentos}/5 \text{segundos}$ ). Para classificação da natação rápida, considerou-se a frequência de cruzamento do plano meridional maior que 5 travessias em um tempo de 5 segundos ( $> 5 \text{cruzamentos}/5 \text{segundos}$ ).



**Figura 7.** Desenho esquemático representativo do plano meridional utilizado como parâmetro de avaliação da natação dos indivíduos em fase de teste comportamental quanto à intensidade do alarme.

As análises de tempo dedicadas a cada padrão natatório e em cada padrão comportamental de interação foram contabilizadas em segundos com software *WatsonMulti 2.6.0*<sup>®</sup> (*SJM*) e os tempos totais e parciais foram anotados, distinguindo fêmeas e machos, bem como as repostas de cada indivíduo de cada grupo experimental. Os parâmetros de natação foram estipulados a partir de uma média elaborada a partir do padrão natatório de 3 pares de animais analisados em fase piloto, observados em tanques-testes em condições idênticas àquelas empregadas para os animais experimentais, exceto para a sequencialidade de exposições ao extrato de pele. As médias simples foram elaboradas primeiramente para um período de 10 minutos totais de observações de natação normal, pré-exposição à substância de alarme, e outros 10 minutos pós-exposição. Neste contexto, para cada animal foram feitas contagens de cruzamentos totais pelo plano meridional em um período de 5 minutos, o que forneceu uma média simples parcial. Este procedimento foi realizado outra vez, completando 10 minutos de observação, e gerando uma segunda média simples parcial. As médias simples parciais foram então contabilizadas em uma média simples final para cada animal. Após a obtenção das médias simples de natação normal de cada animal, as taxas de cruzamento foram reunidas para obtenção de uma média final de cruzamentos de todos os animais observados. O mesmo foi realizado após a administração da substância de alarme, que também gerou uma média final a partir das médias parciais e observação em um período de 10 minutos para cada animal (Eganet al, 2009; Westerfield, 2000).

## ANÁLISE DO COMPORTAMENTO DE CORTE

### NATAÇÃO EXPLORATÓRIA

A natação exploratória foi estabelecida como o padrão natatório lento ( $\leq 5$  cruzamentos / 5 segundos) para ambos os sexos. Os comportamentos de exploração do ambiente foram caracterizados pela natação lenta entre os quadrantes do tanque-teste (Westerfield, 2000; Kalueff et al., 2013).

### COMPORTAMENTO DE CORTE

O comportamento de corte foi observado e compreendido conforme descrito por Darrow & Harris (2004). Considerou-se o tempo total de engajamento em comportamentos de toque (*touching*), perseguição (*chasing*), circulação (*encircling*), zig-zag (*zig-zagging*), guia (*leading*) e acompanhamento (*following*). No comportamento de toque, o macho e a fêmea realizam contato físico do focinho ou da cauda em qualquer uma das partes um do outro. Na perseguição, o macho investe nadando em direção à fêmea, que nada à frente. Na circulação, o macho realiza uma natação circulatória repetitiva ao redor da fêmea. No zig-zag, o macho nada ao lado da fêmea, realizando movimentos em lemniscata. No comportamento de guia, a fêmea induz o macho a nadar seguindo-a para o possível local de postura dos óvócitos. O comportamento de acompanhamento é a resposta do macho a nadar acompanhando a fêmea para o local de postura dos ovócitos e liberação do esperma (Darrow & Harris, 2004; Kalueff et al., 2013).

## ANÁLISE DAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS À SUBSTÂNCIA DE ALARME

### NATAÇÃO RÁPIDA, *DARTING* E *FREEZING*

Os parâmetros utilizados para definir a ocorrência de estresse agudo e alarme foram: natação rápida, *darting* (ou natação errática), e *freezing* (congelamento). Os parâmetros foram considerados conforme descrito por Egan (2009). O *darting* foi considerado como natação rápida do animal com o corpo em ângulo de aproximadamente 45° em relação ao fundo do aquário. O *freezing* foi considerado como total imobilidade do animal, com exceção dos olhos e dos opérculos, por um período maior do que 2 segundos. Considerou-se a elevação do padrão de natação de cada animal para natação rápida ( $> 5$  cruzamentos/5 segundos), sendo contabilizada em tempo total gasto neste comportamento. A ocorrência de *darting* e *freezing* foram também anotadas em segundos e ambos os comportamentos foram verificados em segundos e somados ao tempo total de alarme. Todos os comportamentos de alarme, fossem eles relativos à natação errática e *freezing*, respectivamente, em quadrantes superiores ou

inferiores do aquário, foram contabilizados como expressões de estresse agudo (Egan et al, 2009) e considerados no somatório final do tempo de alarme.

## ANÁLISE COMPORTAMENTAL: CONTABILIZAÇÃO DOS COMPORTAMENTOS DE INTERESSE

Primeiramente, os animais foram observados em vídeo nos primeiros 30 minutos de interação, correspondentes ao protocolo reprodutivo. Os dados coletados configuraram o *tempo total de interação* para cada díade, composto do tempo gasto em comportamentos característicos do comportamento de corte descritos acima. O tempo gasto em natação exploratória foi excluído na computação do *tempo de interação* de cada díade. Em um segundo momento, a partir da administração da substância de alarme e verificação nos 10 minutos subsequentes à cada concentração de extrato de pele, os tempos gastos em cada comportamento característico de alarme foram agrupados, configurando o *tempo total de alarme*, para cada animal. Assim, os dados coletados para o tempo de interação são sempre idênticos para a fêmea e o macho de cada díade, enquanto o tempo de alarme varia entre cada indivíduo.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram analisados 80 animais ao total. Amostras de 18 indivíduos (grupos 1, 2 e 4) e 26 indivíduos (grupo 3) foram empregados segundo os cálculos de tamanho amostral utilizados em Faustino, 2017. Foi realizado o cegamento experimental e randomização das díades testadas.

Os tempos analisados para os comportamentos de corte e de alarme foram correlacionados entre si e analisados estatisticamente. As variáveis quantitativas foram descritas por mediana e amplitude de variação, devido a assimetria dos dados. Para comparar medianas entre os grupos, o teste de Mann-Whitney foi aplicado. Na comparação entre machos e fêmeas, o teste de Wilcoxon foi utilizado.

Para comparar os tempos conforme a concentração, o teste de Friedman foi utilizado. Para verificar a associação entre os tempos de alarme com o tempo de interação, o teste da correlação de Spearman foi aplicado. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p \leq 0,05$ ) e as análises foram realizadas no programa SPSS versão 21.0.

## RESULTADOS

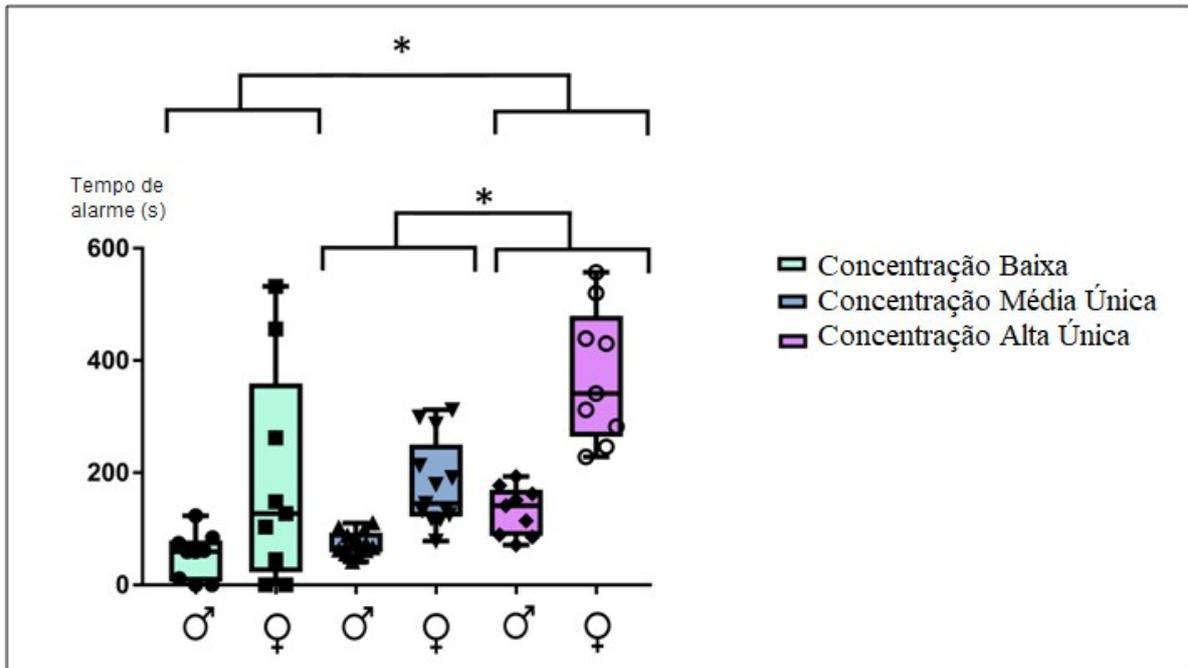
A quantificação e análise dos dados obtidos a partir das observações dos comportamentos buscou averiguar sobre a:

- 1) Existência de resposta de alarme em peixe-zebra mediante contexto reprodutivo;
- 2) Diferença da resposta de alarme entre grupos de animais e entre os gêneros mediante exposição a concentrações únicas da substância de alarme, mediante contexto reprodutivo;
- 3) Existência de adaptação para concentrações progressivas de substância de alarme;
- 4) Influência do tempo de corte sobre o tempo de alarme em cada animal;
- 5) Diferença entre os tempos de resposta de alarme entre os grupos de concentrações progressivas e concentrações únicas da substância de alarme, mediante contexto reprodutivo;
- 6) Diferença entre os tempos de resposta de alarme entre machos e fêmeas, comparando grupos de concentrações alta progressiva e concentração alta única de substância de alarme, mediante contexto reprodutivo.

### RESPOSTA DE ALARME EM PEIXES-ZEBRA MEDIANTE CONTEXTO REPRODUTIVO

#### ANÁLISE DA CORRELAÇÃO CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA ENTRE GRUPOS DE CONCENTRAÇÃO BAIXA, CONCENTRAÇÃO MÉDIA ÚNICA E CONCENTRAÇÃO ALTA ÚNICA

Os resultados que correlacionam concentrações e respostas para controles e testes quanto ao tempo de alarme mediante aplicação da concentração baixa, concentração média única e concentração alta única demonstraram que as respostas de alarme, em concentrações baixas, não diferem significativamente das respostas à concentração média única. Porém, as respostas para concentração baixa diferem significativamente das respostas à concentração alta única. Do mesmo modo, as respostas à concentração média única diferem significativamente apenas das respostas à concentração alta única. Essas diferenças significativas foram observadas tanto para machos quanto para fêmeas (Figura 8).



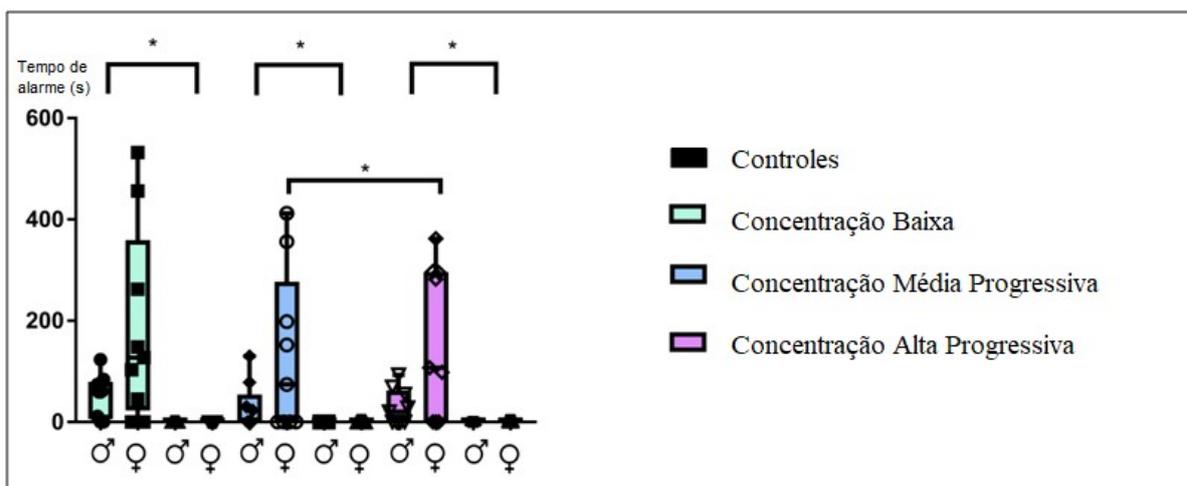
**Figura 8.** Relação concentração-resposta para grupos testes quanto ao tempo total de alarme (os tempos gastos em cada comportamento característico de alarme, *darting*, *freezing*, foram agrupados) mediante aplicação da concentração baixa, concentração média única e concentração alta única (Grupo 1, n = 18; Grupo 3, n = 26; Grupo 4, n = 18; p < 0,05).

#### ANÁLISE DO GRUPO DE CONCENTRAÇÕES BAIXAS E PROGRESSIVAS

De acordo com os dados obtidos quanto à existência de resposta de alarme em peixe-zebra mediante contexto reprodutivo, verificou-se que, comparando testes e controles, fêmeas e machos, confirma-se que há resposta de alarme nos dois gêneros na maioria das concentrações progressivas administradas em sequência. Entretanto, o cenário não se repete para os machos e fêmeas ao receberam a concentração média progressiva, bem como para os machos na exposição à concentração alta progressiva. Nestes animais, a resposta de alarme não foi significativa, comparada com o grupo controle.

Ademais, a heterogeneidade das respostas dos animais se deve à inclusão de dois, dos nove casais, com exibição nula do comportamento de alarme. Para os dois casais-teste do grupo de concentrações progressivas, evidenciou-se a inexistência de qualquer resposta de alarme em todas as 3 concentrações crescentes de substância de alarme administradas (Figura 9). Entre

estes, porém, o indivíduo F5, fêmea, apresentou os comportamentos estereotipados de estresse investigados no presente trabalho apenas na concentração alta progressiva.



**Figura 9.** Comparação entre controles e testes quanto ao tempo de alarme mediante aplicação de concentrações progressivas de substância de alarme. (Controles em cor preta). (Grupo 1, n = 18;  $p < 0,05$ ).

#### TEMPO DE CORTE E TEMPO DE ALARME

Quanto à influência do tempo de corte sobre o tempo de alarme em cada uma das concentrações administradas, notou-se que o tempo de alarme não aumenta com o aumento da concentração de extrato de pele, tanto para machos quanto para fêmeas. Desta maneira, em cada uma das aplicações, embora as concentrações de substância de alarme se tornassem maiores, os animais não intensificaram seus comportamentos característicos de estresse. O tempo de engajamento e diminuição subsequente da resposta em alarme mostrou-se significativa para machos e fêmeas, de forma similar tanto para a concentração baixa como para a concentração alta (Figura 10A-C).

Figura 10A.

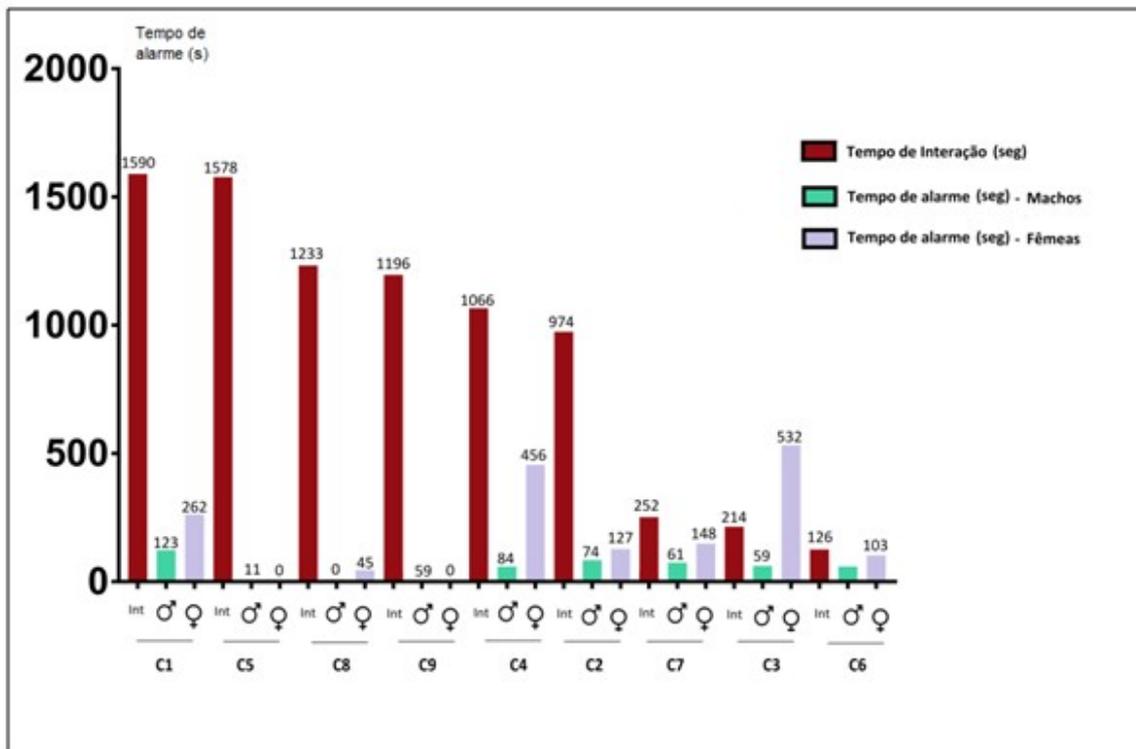


Figura 10B.

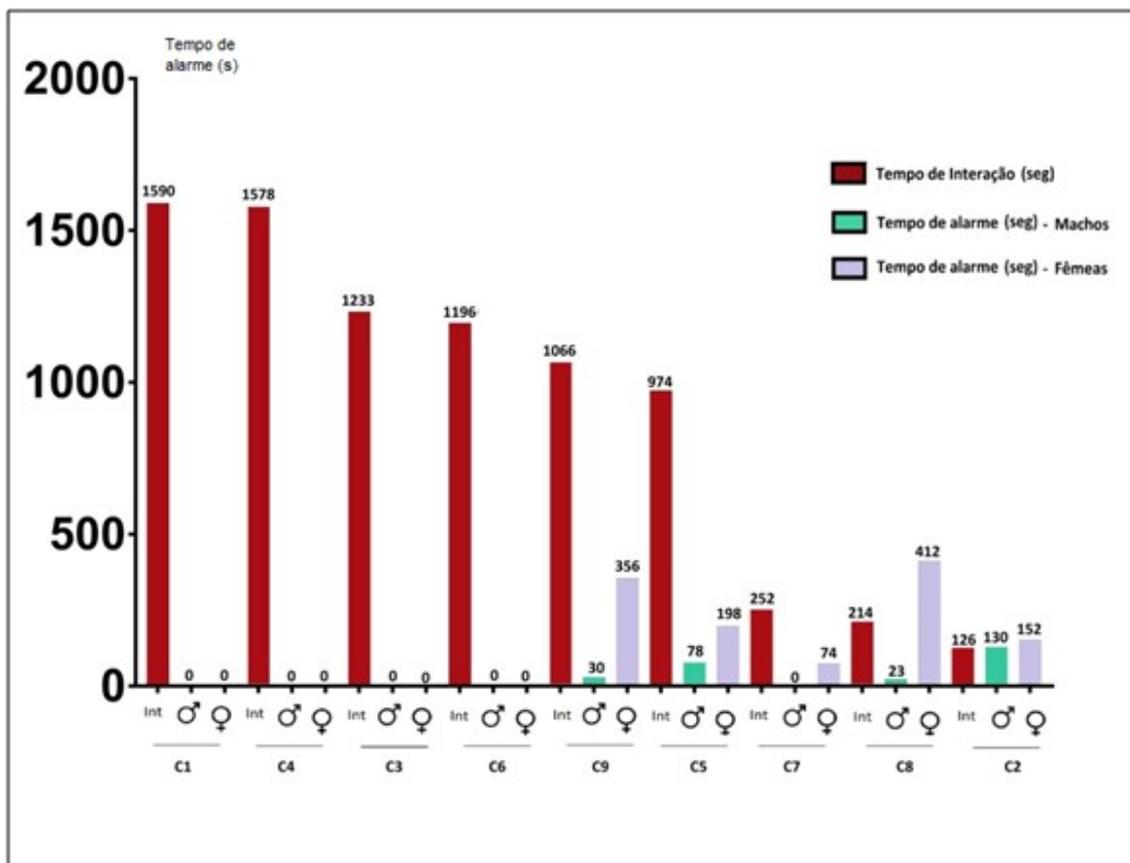
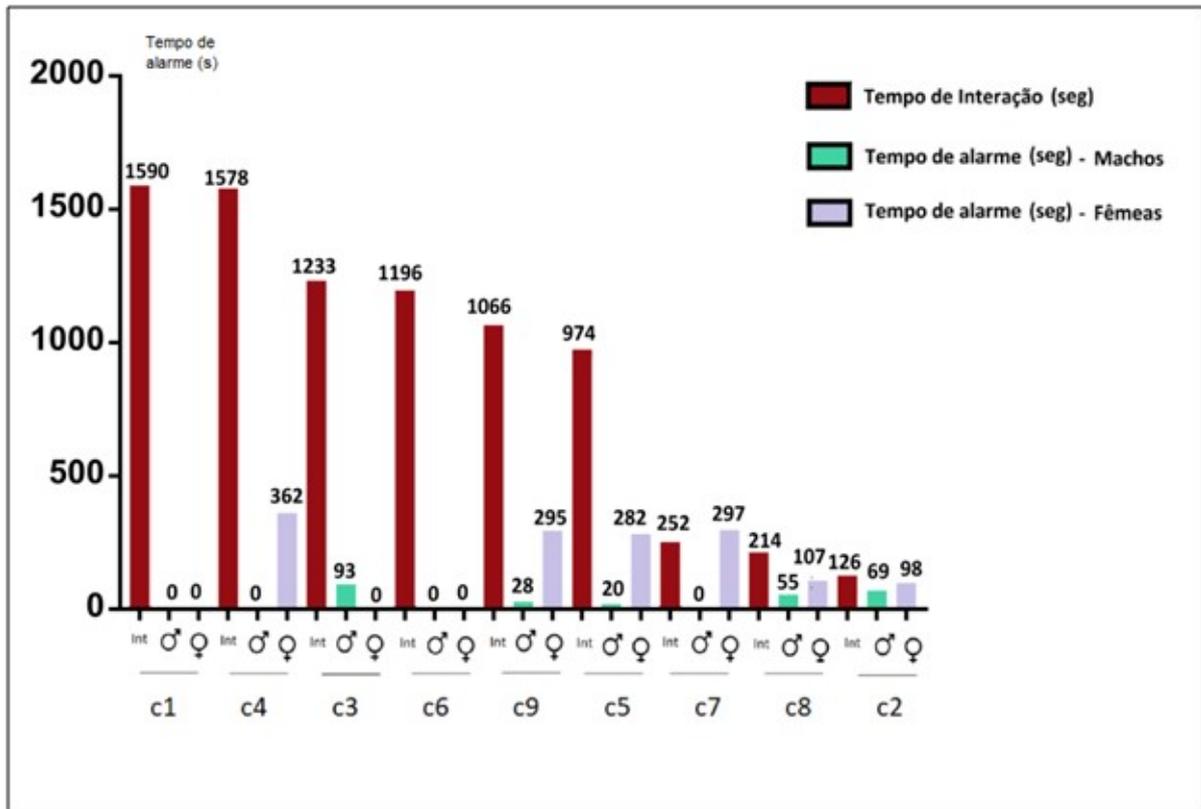


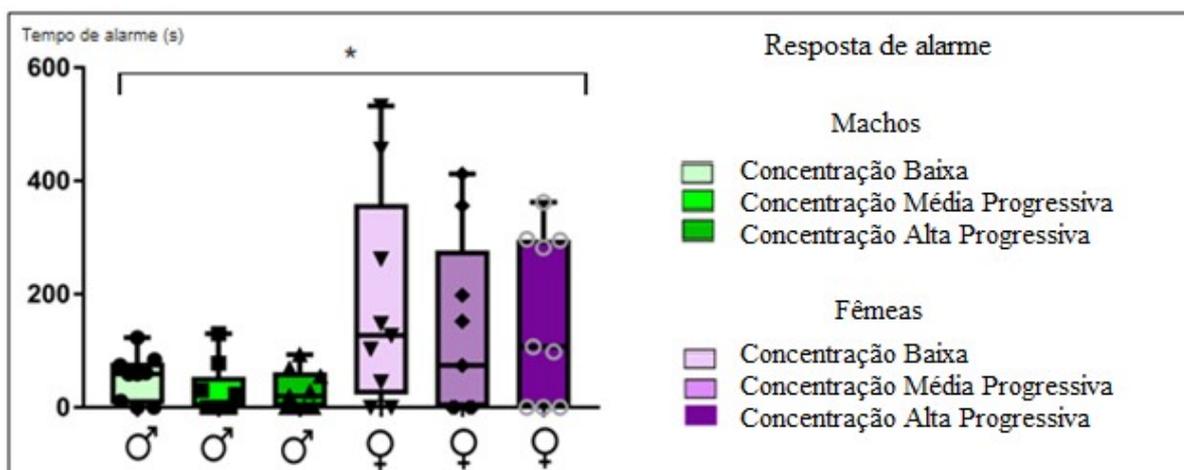
Figura 10C.



**Figura 10 (A-B).** Influência do tempo de corte no tempo de alarme nas concentrações sequenciais de substância de alarme. Quanto maior o tempo de interação, menor o tempo de alarme para todas as três concentrações administradas em sequencial. **A.** Tempo de interação e resposta de alarme para a concentração baixa de substância de alarme. **B.** Tempo de interação e resposta de alarme para a concentração média sequencial de substância de alarme. **C.** Tempo de interação e resposta de alarme para a concentração alta sequencial de substância de alarme. Legenda: c1 a c9 referem-se às diádes 1 a 9. (n = 18).

#### DIFERENÇA DA RESPOSTA DE ALARME ENTRE GÊNEROS

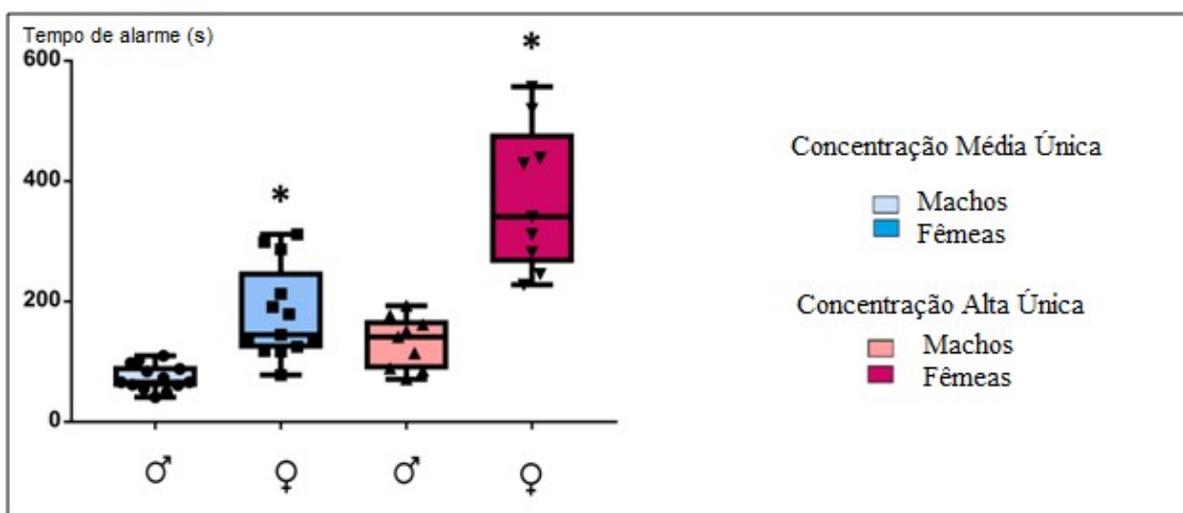
Comparando entre machos e fêmeas quanto ao tempo total de alarme, observa-se que as fêmeas exibem significativamente maior expressão de alarme em relação à reação dos machos. Entretanto, o comportamento de alarme realizado mediante aplicação da concentração alta de extrato de pele, os gêneros expressam comportamento de estresse agudo de forma similar entre si, não havendo diferença significativa para o aumento da resposta entre as concentrações (Figura 11).



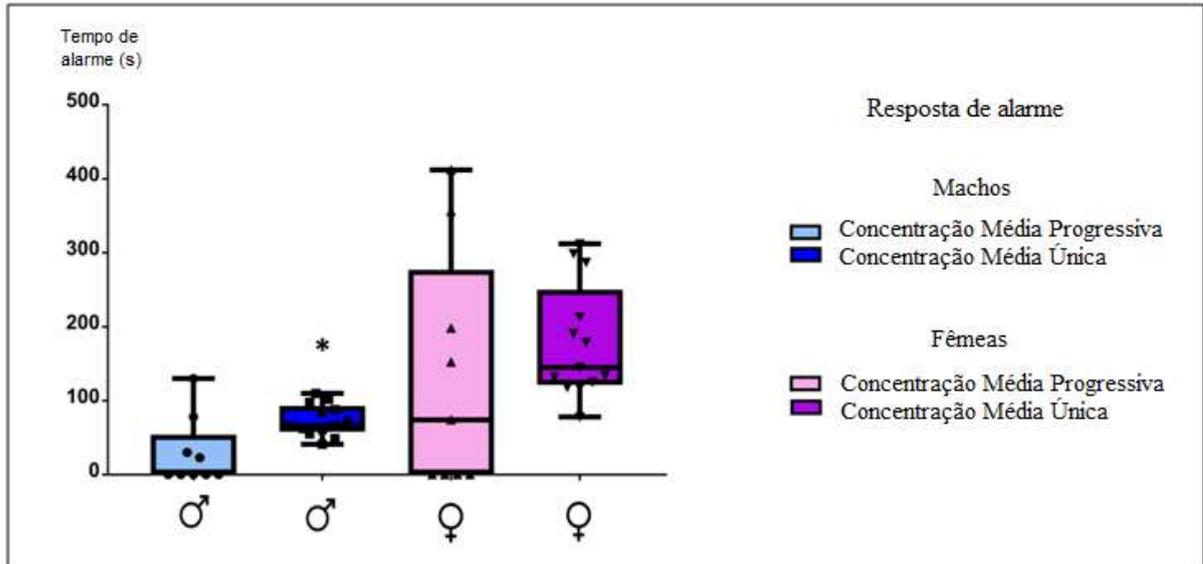
**Figura 11.** Diferença da resposta de alarme entre concentrações crescentes de substância de alarme em fêmeas e machos. Asterisco: diferença significativa entre fêmeas e machos. (Grupo 1, n = 18;  $p < 0,05$ ).

#### ANÁLISE DOS GRUPOS DE CONCENTRAÇÃO ÚNICA

De acordo com as análises, as fêmeas exibiram maior resposta de alarme do que os machos mediante aplicação de concentração média única de solução de extrato de pele (Figura 4). Entretanto, quando comparamos as respostas à concentração média de substância nas aplicações sequenciais e nas aplicações únicas, podemos observar uma maior sensibilidade do macho nas administrações únicas. Sendo assim, as fêmeas não exibem diferenças de respostas entre os dois modos de exposição (Figuras 12 e 13).

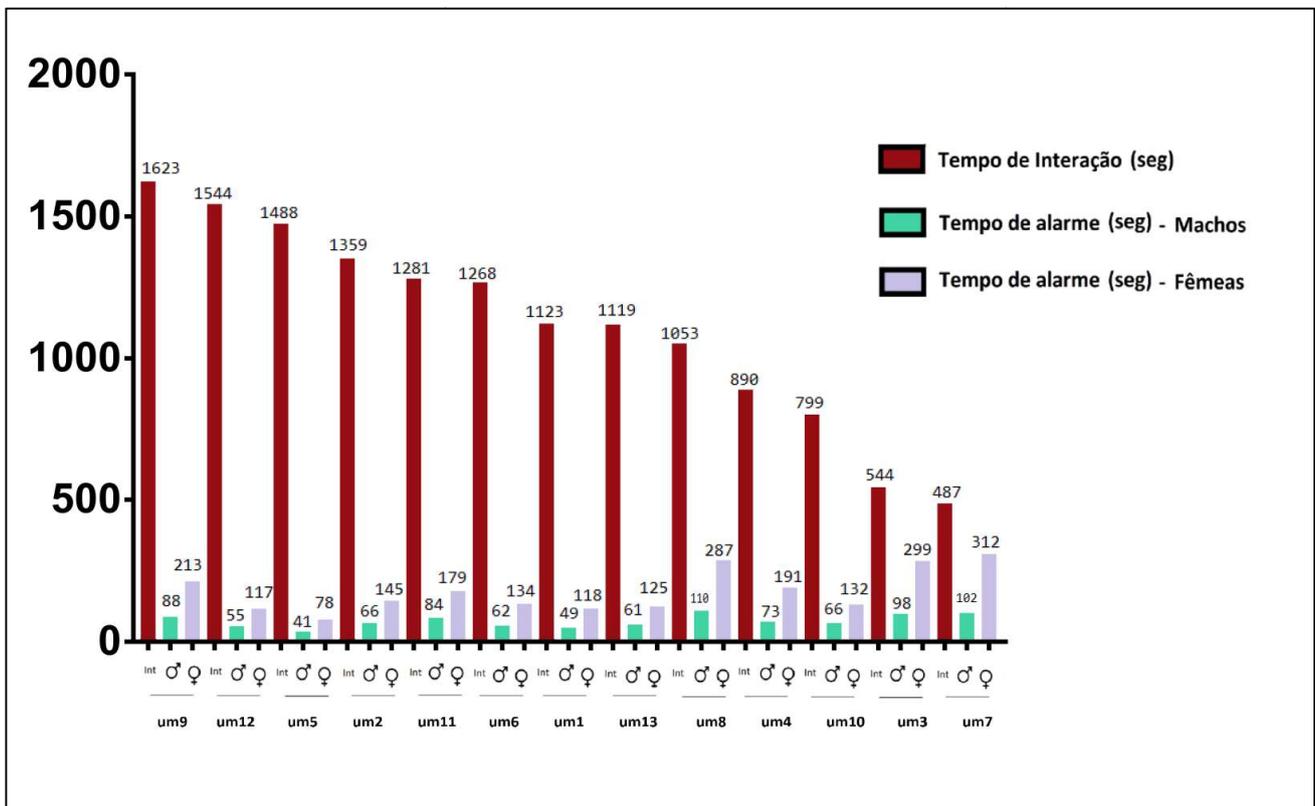


**Figura 12.** Comparação da resposta de alarme mediante aplicação da concentração média única e alta única (Grupo 3, n = 26; Grupo 4, n = 18;  $p < 0,05$ ).



**Figura 13.** Comparação entre respostas de alarme em concentrações médias únicas e progressivas de substância de alarme. Machos são mais responsivos nas aplicações únicas do que nas aplicações sequenciais. Não há diferença entre as modalidades nas respostas nas fêmeas (Grupo 1, n = 18; Grupo 3, n = 26; p < 0,05).

Para os pares tratados com infusão única de solução de extrato de pele na concentração média, observa-se que o tempo despedido em comportamento de corte, não interfere significativamente no alarme exibido pelos indivíduos testados (Figura 14).

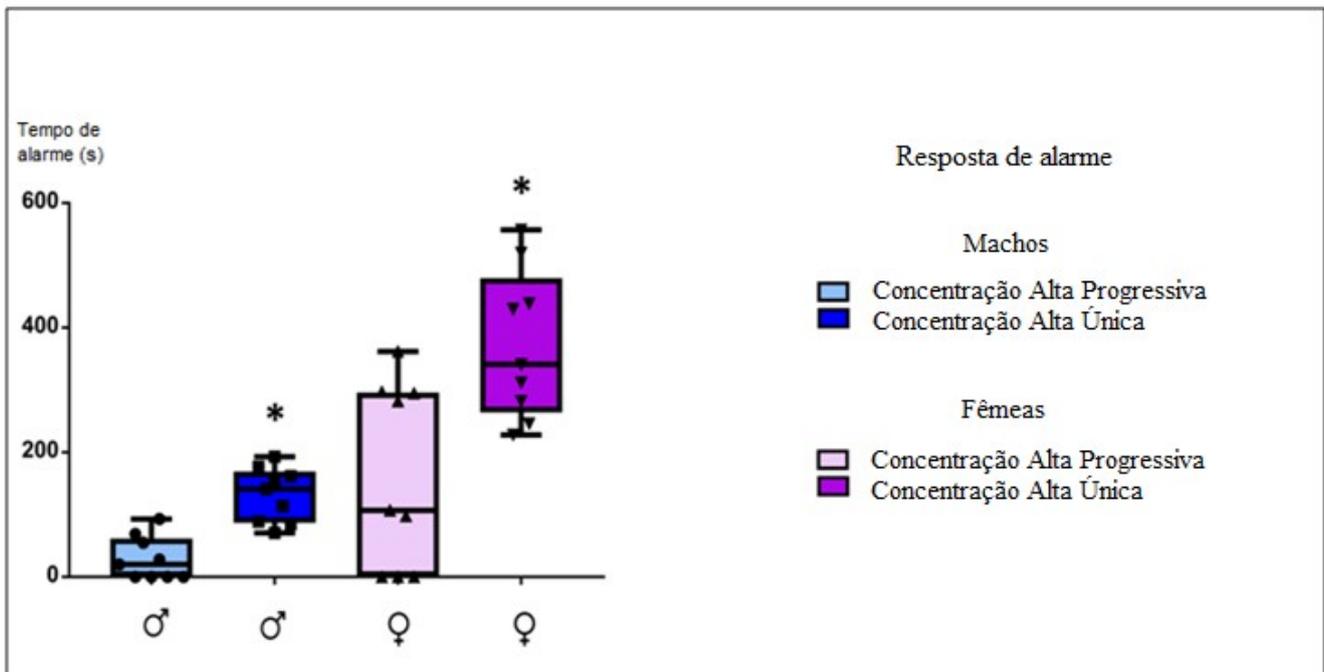


**Figura 14.** Influência do tempo de corte na resposta de alarme de machos e fêmeas mediante aplicação de concentração média única de substância de alarme. Ambos os gêneros diminuem respostas de alarme quanto maior o engajamento reprodutivo, porém, não há significância nos dados encontrados (Grupo 3, n = 26; p < 0,05).

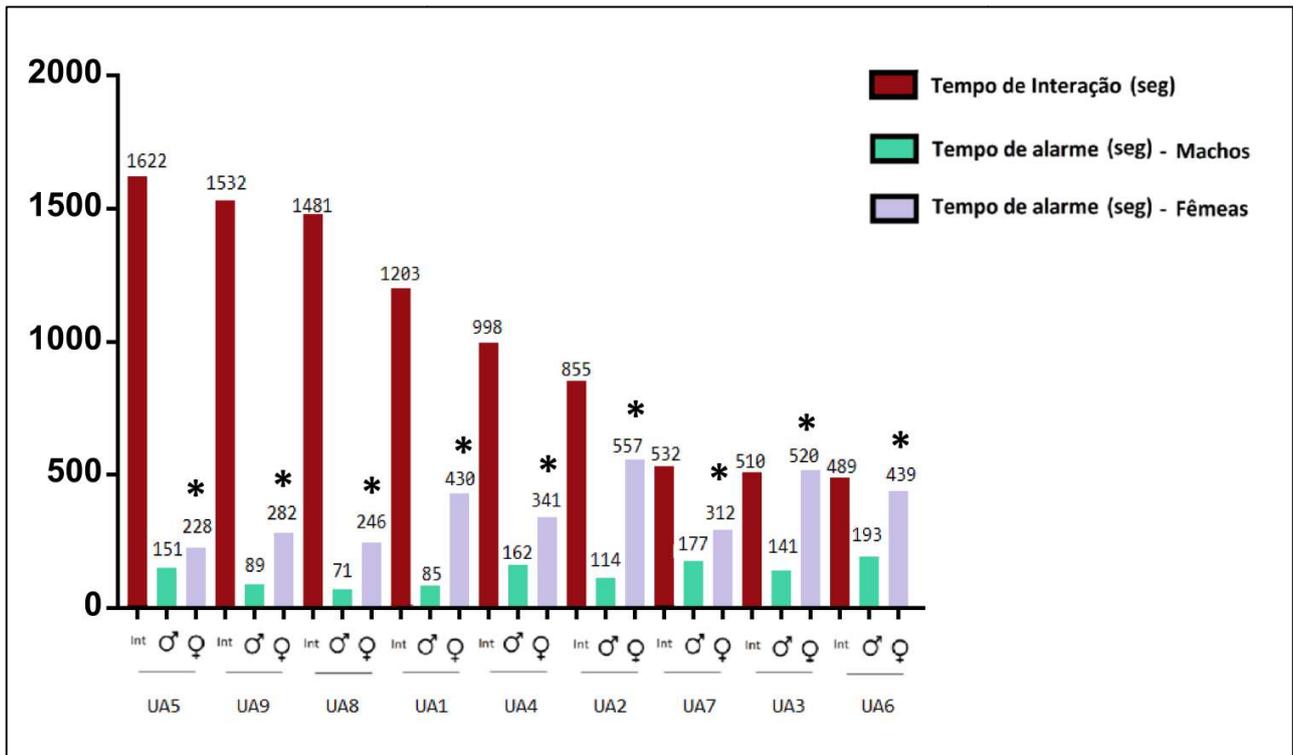
#### ANÁLISE DO GRUPO DE CONCENTRAÇÃO ALTA

Quanto à diferença entre tempos de alarme entre machos e fêmeas, foi realizada a comparação entre grupos de concentrações alta progressiva e concentração alta única de substância de alarme. Nas análises de concentrações altas únicas, ambos machos e fêmeas de cada diáde testada apresentaram maior tempo de alarme do que nas aplicações da concentração alta em sequência. (Figura 15 e 12).

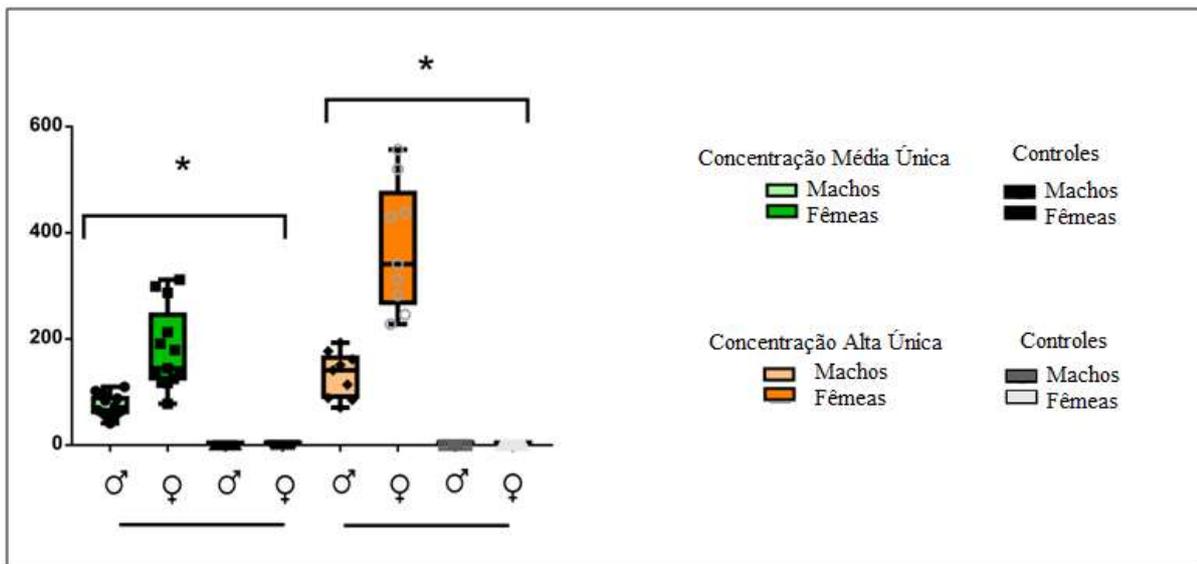
Neste grupo, verificou-se também que quanto maior o tempo de corte entre os animais, menor é o alarme, porém, a associação só se mostrou significativa para as fêmeas (Figura 16). Quando comparados ao grupo controle, os resultados mostram que fêmeas e machos exibiram comportamento de alarme de modo significativo (Figuras 17 e 18).



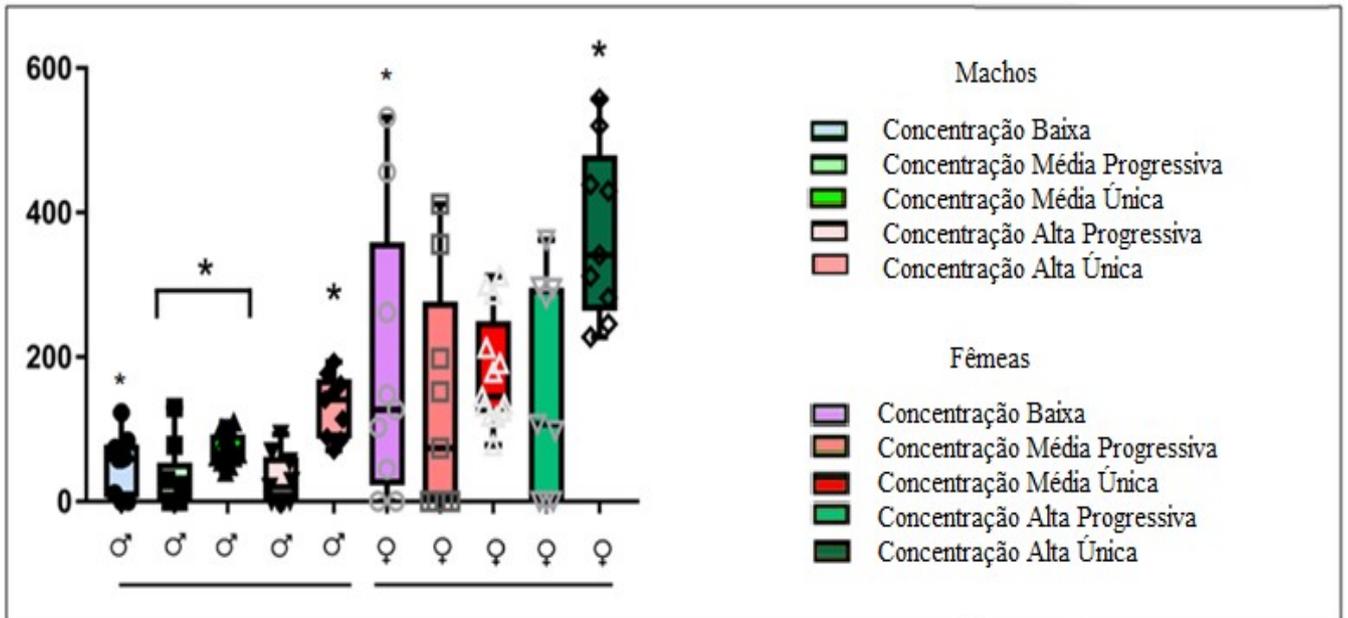
**Figura 15.** Diferença entre respostas de alarme nas concentrações altas progressivas e únicas. Fêmeas e machos são mais responsivos ao alarme quando o extrato de pele é aplicado em concentração única (Grupo 1, n = 18; Grupo 4, n = 18; p < 0,05).



**Figura 16.** Influência do tempo de corte no tempo de alarme para machos e fêmeas mediante aplicação da concentração alta única. Nos machos, o tempo de alarme se mantém inferior ao das fêmeas, mesmo com o aumento do tempo de corte. Asteriscos: há diminuição significativa do alarme conforme aumenta o engajamento reprodutivo nas fêmeas (Grupo 4, n = 18; p < 0,05).



**Figura 17.** Comparação entre controles e testes quanto ao tempo de alarme mediante aplicação da concentração média única e concentração alta única. Para todas as díades da concentração média única e da concentração alta única, as respostas de alarme foram significativas (Grupo 3, n = 26; Grupo 4, n = 18; p < 0,05).



**Figura 18.** Comparação entre respostas de alarme de machos e fêmeas testes em concentrações progressivas e únicas. Respostas na concentração baixa não são significativamente maiores do que as respostas na concentração média sequencial ou na concentração alta sequencial. Respostas na concentração média única são significativamente maiores do que as respostas na concentração média sequencial para machos. As fêmeas não diferem nas duas modalidades. Respostas na concentração alta única são maiores para ambos os gêneros em comparação com as respostas na concentração alta sequencial. Em concentrações baixas, a resposta de alarme difere da resposta das fêmeas, sendo significativamente menor (Grupo 1, n = 18; Grupo 3, n = 26; Grupo 4, n = 18; p < 0,05).

**Tabela 1.** Sumário das respostas de machos e fêmeas frente às diferentes circunstâncias experimentais realizadas no presente trabalho.

	Resposta aversiva				
	Concentração baixa	Concentração média	Concentração alta	Concentração média progressiva	Concentração alta progressiva
Fêmeas: há correlação com tempo de corte?	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
Machos: há correlação com tempo de corte?	Sim	Não	Não	Sim	Sim
Fêmeas: Resposta Significativa?	Não difere da concentração média progressiva	Difere da concentração alta progressiva	Sim	Não difere da concentração baixa	Difere da concentração média progressiva
Machos: Resposta Significativa?	Não difere da concentração média progressiva	Difere da concentração alta progressiva	Sim	Não difere da concentração baixa	Não difere da concentração baixa
Machos possuem maior resposta do que fêmeas?	Não	Não	Não	Não	Não
Fêmeas possuem maior resposta do que machos?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Machos respondem mais em concentração média única do que sequencial?	Sim				
Fêmeas respondem mais em concentração média única do que sequencial?	Não				
Machos respondem mais em concentração alta única do que sequencial?	Sim				
Fêmeas respondem mais em concentração alta única do que sequencial?	Sim				

## ANÁLISE HISTOLÓGICA

### CONFIRMAÇÃO DO GÊNERO E DO ESTÁGIO REPRODUTIVO DOS ANIMAIS UTILIZADOS

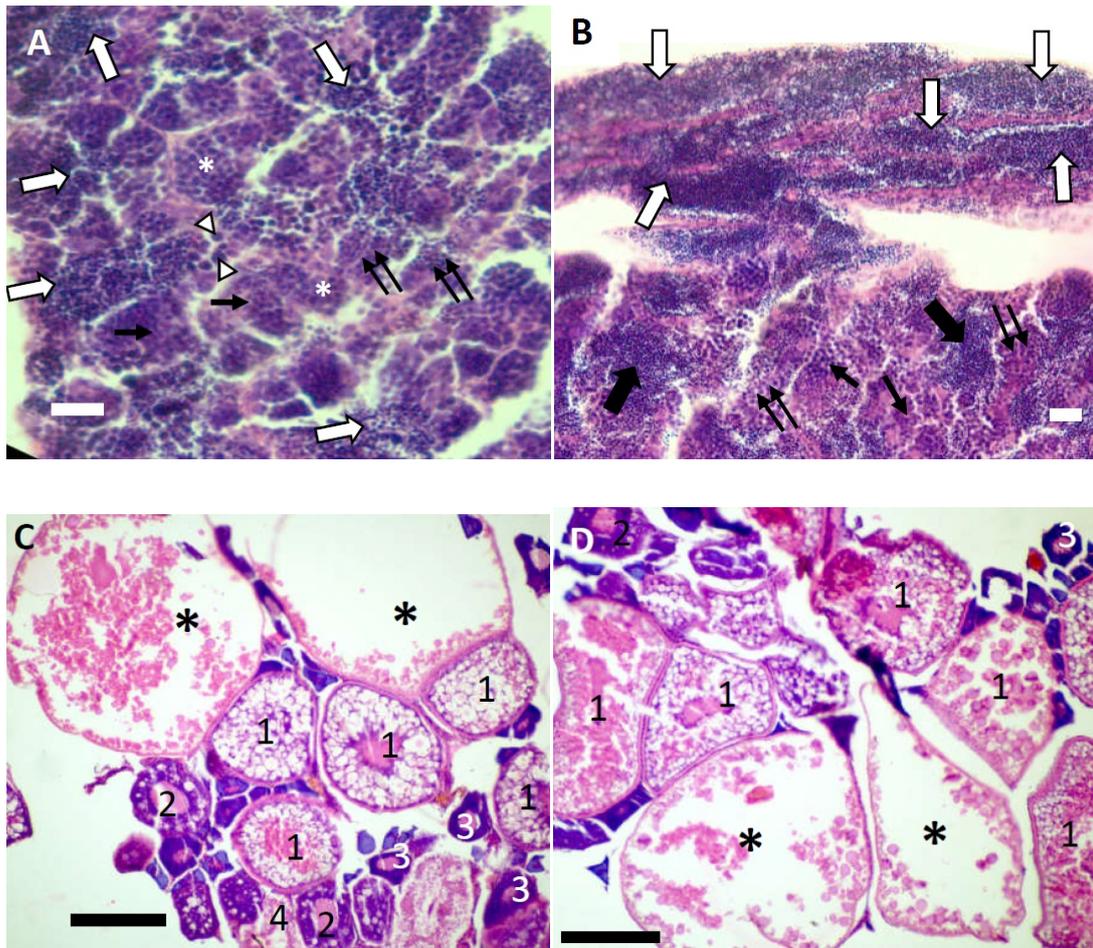
Encontramos uma grande uniformidade nas características ovarianas. Foi possível identificar todos os estágios foliculares e muito poucas ovogônias nos ovários (Figura 19 C, D). A presença simultânea de folículos em diferentes estágios é comum em espécies com reprodução cíclica não sujeita a variações sazonais. Em cativeiro, peixes-zebra fêmeas mostram ciclos de poucos dias de duração.

Entretanto, para classificar uma fêmea na fase madura ou em prontidão à desova é importante observar nos ovários a presença de folículos no último estágio de maturação, no qual o folículo apresenta mais de 600  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Selman et al 1993; a medida referida é em condições prévias à fixação; após a desidratação e demais procedimentos histológicos, pode se considerar um diâmetro em torno de 500  $\mu\text{m}$ ).

Observamos a presença mais frequente de folículos maduros e pré-vitelogênicos em comparação às fases I ou II, o que caracteriza preparação para a desova. E, ainda, encontramos folículos pós-ovulatórios (Figura 19 D), sinalizando que já ocorreu ovulação recente.

Entre os aspectos mais marcantes nos testículos analisados, observamos sempre um epitélio do tipo descontínuo, pois os espermatozoides prontos passam a aparecer fora dos cistos, no lúmen dos lóbulos (Figura 19 A), caracterizando, assim, que estava ocorrendo ou já tinha ocorrido a fase de espermiacção nos testículos analisados, em que os espermatozoides já foram liberados para os túbulos e estão em processo de maturação. E as espermatogônias eram escassas e esparsamente distribuídas, provavelmente por estarem passando por mais transformações meióticas sem reposição pelas células germinativas, de forma que no epitélio dos cistos aparecia apenas uma camada fina de células de Sertoli, conferindo assim, o aspecto descontínuo observado.

Quando também puderam ser observados os túbulos seminíferos nos cortes dos testículos (Figura 19 B), estes apareceram repletos de espermatozoides, indicando preparação para a desova. Enquanto foram observados gametas maduros nos túbulos, os cistos ainda possuíam grande número de espermátides em estágios finais, indicando que os testículos ainda não estavam em fase de regressão, realizando espermiogênese e mais espermiacção.



**Figura 19.** Fotomicrografia de seções histológicas de gônadas de diferentes peixes-zebra *Danio rerio* adultos. **A.** Testículo com cistos contendo espermatócitos (asterisco) ecistos com espermatídes de diferentes estágios de espermiogênese, iniciais (seta) e avançadas (seta dupla). Muitos espermatozoides livres, fora dos cistos (seta larga), indicando espermição. Na fase madura as espermatogônias (cabeça de seta) são menos visualizadas e o epitélio é descontínuo. **B.** Presença de um grande número de espermatozoides liberados dos cistos (seta larga), enquanto espermatídes tardias (seta dupla) e iniciais (seta menor) ainda são encontradas nos cistos deste testículo. Os túbulos seminíferos no alto da imagem aparecem repletos de espermatozoides (seta branca). **C, D.** Ovários de duas fêmeas com folículos em diferentes etapas. Enquanto aparecem folículos maduros (asterisco), na fase ovulatória permanecem no ovário folículos no estágio vitelogênico (1), ou iniciais (2) e um número menor de folículo sem estágio de crescimento primário (3). A presença de folículo pós-ovulatório (4) indica que ocorreu desova. Escalas: A e B = 20  $\mu\text{m}$ ; C e D = 200  $\mu\text{m}$ .

## DISCUSSÃO

### ANÁLISE DAS APLICAÇÕES DE CONCENTRAÇÕES PROGRESSIVAS

O efeito aversivo do extrato de pele coespecífica, descrito por von Frisch (1938), e a forma de quantificação das concentrações, proposta por Waldman (1982) e Speedie e Gerlai (2008), tem se mostrado eficaz e reproduzível em diversos protocolos farmacológicos (Maximino et al, 2014; Quadros et al, 2016; Lima et al, 2015, 2016; Ziani et al, 2018) e fisiológicos (Egan et al, 2009; Canzian et al, 2017; Faustino et al, 2017) em peixe-zebra. A substância sintetizada na epiderme e liberada para o meio externo é uma mistura de diferentes compostos, os quais vêm sendo analisados há décadas (Pfeiffer, 1963, 1985; Schutz, 1956; Lebedeva et al, 1975; Brown et al, 2000 – referências citadas por Jesuthasan & Mathuru 2008).

Dentre as substâncias que o extrato bruto de pele de peixes pode conter, o glicosaminoglicano condroitina (Van de Winkel et al, 1986) possui o efeito de disparar as respostas de medo e de ativar a mesma região do bulbo olfatório que o extrato (Mathuru et al 2012). Entretanto, as condroitinas não disparam as respostas de medo com a mesma amplitude que o extrato bruto de pele, o que significa a possível presença de outras substâncias ativas no extrato (Mathuru et al, 2012). A heterogeneidade da sulfatação dentro da molécula de condroitina pode ser uma possível explicação para o reconhecimento variado entre as espécies de peixes (Pfeiffer, 1977). O extrato bruto que foi obtido no protocolo do presente trabalho foi de eficácia comprovada para provocar a resposta de alarme no peixe-zebra, uma vez que todas as concentrações resultaram em comportamento de alarme de forma significativamente diferente dos controles.

Segundo os dados obtidos, a presença de comportamento de alarme dos animais quando expostos ao extrato de pele ocorre em machos e fêmeas mesmo em concentração baixa. Entretanto, quando expostos à concentração média após a exposição à concentração baixa de substância de alarme, os machos e fêmeas não exibem alarme de maneira significativa, e essa relação é inversamente proporcional ao tempo de interação entre os animais. Esta diminuição da resposta de alarme total, conforme aumenta a interação, indica a influência do contexto reprodutivo na sensibilidade ao feromônio de alarme em peixe-zebra.

Nas comparações relativas à concentração de extrato de pele administrada e a subsequente resposta de alarme, observamos que a resposta de alarme não aumenta com o aumento da concentração de substância de alarme, comparando concentrações baixas e médias

do extrato de pele. Porém, a resposta de alarme é significativamente maior nas aplicações de concentrações altas de extrato de pele. Como não foi observada elevação significativa do comportamento de estresse com o aumento da concentração - de baixa para média - de substância de alarme, podemos presumir a ocorrência de interferência do contexto reprodutivo na expressão do comportamento anti-predatório. Entretanto, a presença significativa da expressão de comportamento de estresse frente a concentrações altas únicas sugere a existência de um limiar, no qual o estímulo olfatório de alarme torna-se intenso o suficiente para ultrapassar a capacidade tamponante do contexto reprodutivo.

Já em contextos de misturas binárias de odorantes, mecanismos diversos precisam ser evocados para compor o caráter explicativo potencial. As evidências demonstram que, em contextos de exposição a um odorante-alvo sobreposto a um odorante de segundo plano, as células dos glomérulos continuam respondendo à substância de fundo e à nova substância de maneira similar. Entretanto, neurônios do córtex piriforme anterior são capazes de distinguir a presença de uma substância-alvo, filtrando os sinais advindos da substância em primeiro plano (Kadohisa & Wilson, 2008). Assim, o córtex piriforme é um centro capaz de detectar modificações nos estímulos, como um local de triagem de contraste de estímulos advindos da periferia, e é um candidato em potencial para modulações centrais no sistema de alarme pelo sistema reprodutivo.

No cenário do presente trabalho, os receptores de ligação a componentes da substância de alarme poderiam estar diminuídos nos neurônios sensoriais, de modo análogo à diminuição da expressão fenotípica de *club cells* no epitélio, diminuindo a taxa de disparos ascendentes. Em segundo lugar, a codificação de informação sob adaptação dos neurônios sensoriais no circuito primário com o glomérulo, mediante manutenção das concentrações de substância de alarme, poderia também estar alterada negativamente, modificando a percepção do organismo acerca da concentração de sinais químicos no ambiente.

Em suma, os dados obtidos pelo presente trabalho combinados com informações disponíveis na literatura, portanto, sugerem que o engajamento em comportamento reprodutivo poderia interferir de modo a aumentar o limiar de sensibilidade à substância de alarme, talvez influenciando as propriedades de transdução do sinal olfatório, proporcionando a ocorrência de adaptação, que poderia ser em nível periférico e/ou central.

Quando consideramos a ausência de resposta significativa nos machos mediante aplicação da concentração alta progressiva, podemos visualizar a ocorrência de uma adaptação mais expressiva no gênero masculino comparativamente ao gênero feminino em peixe-zebra.

Os dados indicam a existência de diferenças à sensibilidade ao estresse dos gêneros mediante contexto reprodutivo. Considerando o dimorfismo comportamental existente em várias espécies, sugere-se que, neste caso, a maior adaptação dos machos aos sinais de alarme se relaciona à possibilidade de influência de comportamentos agressivos em outros sistemas comportamentais (Oliveira et al., 2011).

Nos grupos em que houve redução do comportamento de estresse pelo contexto reprodutivo, expresso pela modulação da adaptação, podemos supor a ativação concorrente de duas redes neuronais. É possível supor a existência de uma hierarquia entre esses dois sistemas comportamentais, com favorecimento do engajamento reprodutivo. Embora haja flutuações a cerca das circunstâncias nas quais a reprodução é favorecida em detrimento do estresse, é possível que muitos dos estímulos ambientais e fisiológicos anteriores ao contexto de teste contribuam para a determinação do nível de alarme em cada animal.

Assim, dadas as circunstâncias onde os indivíduos apresentam condições hormonais e sociais propícias ao acasalamento, bem como baixo nível intrínseco individual de estresse, o comportamento de corte não só se expressa significativamente, quanto também seria capaz de interferir na expressão do alarme. Uma das hipóteses explicativas para ocorrência de tal, seria a existência de um "sistema regulador de risco", análogo às categorias de tomada de decisão presente em primatas (O'Doherty et al, 2017). A sustentação desta regulação deve reportar-se por núcleos encefálicos de aferências em comum aos dois sistemas comportamentais (O'Doherty et al, 2017; Juavinett et al, 2018). Estas áreas de influxo informacional poderiam, então, receber sinais periféricos ascendentes do epitélio olfatório, de sinais vegetativos e de regiões afetivas como o pálido dorsomedial e outras áreas-alvo do bulbo olfatório já citadas, de modo que o limiar de ativação para ações de fuga (assim como para ações de agressão, exploração ou alimentação) seriam, assim, diminuídos ou silenciados.

É importante notar que, embora seja evidente a ocorrência de diminuição do alarme pelo contexto reprodutivo, e haja uma aparente hierarquia entre os sistemas comportamentais, elas não são absolutas. Os sinais de uma determinada natureza podem modular a expressão de um comportamento até um ponto específico, que varia entre os gêneros, os estados intrínsecos de cada indivíduo, como o período do ciclo de vida em que os animais se encontram ou o contexto, como condições ambientais ou alimentares.

Em dois casais do grupo de concentrações sequenciais, observamos a inexistência de resposta a todas as concentrações crescentes aplicadas em sucessão (à exceção de uma fêmea que respondeu na concentração alta). Estes dados poderiam indicar a possibilidade da influência

do grau de maturidade e prontidão sexual no momento dos testes. A maturidade sexual em peixe-zebra é dependente de aprendizado social e de desenvolvimento fisiológico apropriado (Darrow & Harris, 2004).

Para garantir a homogeneidade neste quesito, todos os indivíduos adultos foram alocados em tanques-residência com a presença de fêmeas e machos reunidos. Entretanto, uma possibilidade para a ausência de resposta de alarme nestes quatro indivíduos pode remeter ao estágio reprodutivo em que se encontravam, o qual resultaria em uma influência hormonal diferenciada sobre o comportamento, como foi visto em *Carassius carassius* (Lastein et al, 2008). Como não foi possível quantificar o nível de maturação apenas pela análise histológica das gônadas, tendo sido possível apenas diferenciar se estavam com maturidade adequada para o acasalamento ou não, o ideal para uma possível quantificação seria incluir a apreciação dos níveis de hormônios esteroides, coletando o sangue no momento da eutanásia ou logo após os testes. O nível de 17-20 $\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-one, por exemplo, permanece alto no período pré-ovulatório e recém pós-ovulatório em salmões (Pankhurst, 2008).

É importante assinalar para estudos futuros que algumas peças anatômicas referentes aos ovários das fêmeas revelaram, sob microscopia óptica, um declínio do estado de conservação tecidual realizada mediante a utilização de formol 10%, havendo a necessidade de conservação de ovários em concentrações diferentes e mais eficientes. Um dos motivos para o estado subótimo de alguns tecidos pode ser a própria constituição *sui generis* muito delicada da parede ovariana, que contém poucas fibras de músculo liso e um fino epitélio (Selman et al, 1993). Estas características deixam o tecido muito friável na preparação das lâminas histológicas, especialmente aqueles que estão na fase madura, onde há grandes folículos e em maior número.

Para trabalhos futuros que necessitem de conferência do estágio reprodutivo, sugerimos fórmula alternativa de fixador que preserve melhor a estrutura ovariana (como sugerido no OECD, nº 123, 2010) ou realizar a medida e contagem de folículos antes de fixar a gônada. É possível, com a imersão do ovário em solução, fazer o isolamento dos folículos com instrumental delicado e, depois realizar as medidas sob microscópio cirúrgico (Selman et al, 1993).

Diferente dos ovários, os testículos foram mais facilmente preservados, pois as etapas da espermatogênese envolvem células menores que ficam contidas em cistos formados pelas células de Sertoli. Mesmos após liberados, os espermatozoides são encontrados compactados no lúmen dos túbulos, o que permite uma preservação mais fácil da estrutura do que os ovários maduros.

Outra alternativa para a avaliação dos estados reprodutivos nos animais seria proceder a dosagem de  $17\text{-}20\beta\text{-dihidroxi-4-pregnen-3-ona}$  presente no plasma logo após os testes comportamentais (Waring et al, 1996), bem como realizar a verificação de receptores para este esteróide em estruturas centrais como, por exemplo, os núcleos hipotalâmicos.

## ANÁLISE DAS APLICAÇÕES DE CONCENTRAÇÕES ÚNICAS

Nas verificações realizadas para as concentrações médias aplicadas em evento único, observa-se que, embora haja correlação inversa entre tempo de corte e estresse, o tempo de corte não possui significância sobre a resposta de alarme nas fêmeas. Este tempo de alarme é igual àquele onde a concentração alta foi aplicada de modo progressivo. Assim, podemos inferir em um primeiro momento que não há adaptação nas fêmeas, mas há uma atenuação do estresse dependente do comportamento reprodutivo, pois no grupo de concentrações progressivas a diminuição do alarme é significativa, não havendo aumento do comportamento de estresse.

Por outro lado, a menor resposta das fêmeas independentemente da forma de exposição à concentração média da substância, pode sugerir a influência dos níveis hormonais como elemento chave na prontidão sexual e, portanto, na atenuação do estresse. Em relação aos machos deste mesmo grupo, constata-se do mesmo modo, que não há diminuição significativa do alarme quanto maior for o tempo de corte. Estes dados podem ser relacionados à maior homogeneidade dos tempos de alarme obtidos, em comparação ao grupo de concentrações progressivas. Contudo, constata-se a ocorrência de maior estresse nos machos quando a concentração média é aplicada em evento único do que sequencial. Quando consideramos em conjunto as duas constatações, podemos inferir que há adaptação na concentração média sequencial, mas ela não se dá somente devido ao engajamento sexual. Desta forma, podem ser associados possíveis mecanismos de adaptação dos receptores olfatórios.

Assim, sugere-se que nos machos, outros fatores reúnem-se em prol da diminuição do estresse. Em primeiro lugar, é importante frisar que o comportamento sexual no gênero masculino depende em grande parte da detecção do feromônio sexual,  $\text{PGF}2\alpha$ , liberado pelas fêmeas (Kobayashi et al, 2002). Os fatores intrínsecos de variações fisiológicas individuais, bem como os fatores sociais e hierárquicos entre os machos são elementos passíveis de modulação da susceptibilidade ao estresse. Este quadro pode, portanto, estar por trás da manutenção dos níveis de alarme em machos, mesmo em condições reprodutivas.

Verifica-se que o alarme é maior quando a aplicação é dada de modo único do que em progressão no grupo de concentração alta única, de modo que os dados analisados indicam uma correlação positiva entre engajamento em comportamento reprodutivo e menor quantidade de estresse nas fêmeas. Neste conjunto, podemos perceber de modo mais claro que, nas fêmeas, o contexto reprodutivo interfere na expressão do alarme, seja ele em nível periférico ou central.

Não estão claras as contribuições dos possíveis mecanismos reguladores do estresse nas circunstâncias estudadas. É possível que tanto a regulação nas primeiras fases do processamento olfatório ou em nível central estejam presentes, mas poderíamos creditar aos elementos centrais um maior papel na redução do estresse em contextos reprodutivos devido às flutuações hormonais que acompanham os ciclos de maturação das células reprodutivas. Neste sentido, é necessário atentar para a atuação de androgênios e estrogênios sobre as áreas pré-ópticas, bem como para secreção de gonadotrofinas na hipófise anterior (Woolley et al, 1998), áreas também altamente responsivas à estímulos estressantes.

Ademais, o engajamento reprodutivo coopta os sistemas dopaminérgicos, serotoninérgicos e opioidérgicos das regiões do estriado dorsal e ventral, que podem modular, por sua vez, áreas límbicas como o complexo amigdaliano e a substância cinzenta periaquedutal (PAG) (Berridge et al, 2009). A área cinzenta periaquedutal é ativada durante os comportamentos defensivos como *freezing* e fuga, e, além disso, neurônios da PAG fazem parte da via originária do núcleo ventromedial do hipotálamo que participa da produção da postura de lorconcentração em fêmeas de ratos durante a cópula. Esta região também é responsivas à opióides endógenos, sendo ativas na modulação da dor (Deng, 2016; Kobayashi et al, 2002; Mahler et al., 2012).

Analisando as respostas dos grupos sugere-se que, nas fêmeas, a resposta de estresse poderia depender mais do tempo de corte e dos níveis hormonais, com modificação central do processamento, enquanto, nos machos, a modulação central e adaptações em nível epitelial de processamento frente aos estímulos químicos poderiam concorrer com influências semelhantes. Nos machos, o cenário se repete em relação à concentração média única, pois o tempo dedicado à corte diminui a resposta ao estresse, porém, a correlação não é significativa. Em contrapartida, observamos que há diferença da resposta dos machos entre as duas modalidades de aplicação da concentração alta. Nos casos de aplicações únicas, vemos um maior tempo de alarme do que nas progressivas. Para os casos testados, podemos apontar a adaptação associada ao aumento do tempo de corte pela da linearidade da resposta de alarme, não havendo aumento progressivo do estresse.

Em contexto natural, a concentração de substância de alarme produz estresse em intensidades proporcionais em carpa (*Cyprinus carpio*). Uma das interpretações associa a intensidade de alarme à distância relativa da fonte do sinal (Doving & Lastein, 2009). E a resposta de fuga pelo estímulo olfatório é, portanto, um processo graduado e não uma resposta “tudo-ou-nada”. Sendo assim, quanto maior a concentração de substância dissolvida em uma determinada área, maior o vigor do comportamento de fuga e maior o estresse do animal. A ocorrência de alarme nas aplicações únicas das concentrações médias contrasta com a ausência de alarme nas diádes do grupo de exposição progressiva à substância de alarme no presente experimento. Deste fato deriva a observação de que a ausência de alarme nas condições progressivas pode ser creditada mais ao componente de alterações nos processos de adaptação pelo engajamento reprodutivo ou por outro processo de adaptação sensorial diferenciada nos machos em relação às fêmeas.

No caso dos machos do grupo de exposição única à substância de alarme em concentração alta, os machos também exibiram resposta de alarme significativa. Entretanto, quando a exposição é feita de modo progressivo, os machos não exibem resposta significativa. A diferença entre os dois grupos de machos deriva a apreciação de que a exposição sequencial influencia a ocorrência de alarme, e, neste caso, os machos podem ter seus processos inibitórios de estresse mais dependentes de modulações periféricas, ainda que não possam ser descartados outros mecanismos de controle centrais distintos. Estas modulações são sugestivas da influência do contexto reprodutivo.

## CONCLUSÃO

O comportamento reprodutivo pode reduzir o comportamento de alarme dos animais quando frente à exposição gradativa de substância de alarme, considerando que foi encontrado correlação entre o tempo de corte e menor resposta ao extrato de pele exposto de forma progressiva.

O comportamento reprodutivo contribui para a diminuição do estresse inato relativo à predação (comportamento de preservação e fuga). Sugere-se que essa modulação poderia resultar de possíveis de modificações quanto à adaptação ao sinal de alarme ou a mudanças nas vias paralelas centrais, podendo estar relacionadas a um nível hormonal específico do contexto de acasalamento.

Os níveis de modulação caracterizam-se indicativamente pela adaptação periférica em machos e pela alteração de processamento central em fêmeas. Entretanto, considera-se que as duas modalidades de alterações poderiam estar presentes nos dois gêneros.

As aplicações em concentrações únicas da substância de alarme aumentam o comportamento de estresse agudo dos animais de modo geral. Entretanto, as fêmeas são mais suscetíveis ao estresse quanto menor for o engajamento em comportamento reprodutivo. Para estas, o estado hormonal e fisiológico do estágio de ovulação, poderia, talvez, ter um fator mais preponderante na modulação ao estresse do que nos machos.

No contexto de diminuição do estresse dos machos, outros fatores além do componente sexual poderiam se somar na produção do comportamento exibido pelos indivíduos: susceptibilidade ao estresse, adaptação periférica e agressividade.

A resposta de alarme é restringida nos animais pelo contexto reprodutivo em concentrações baixas e concentrações médias da substância de alarme, tanto em exposições únicas quanto em exposições sequenciais. Nas exposições sequenciais, há, inclusive uma diminuição mais expressiva do estresse, o que indica a atuação concomitante de adaptação que pode ser periférica e/ou central. Embora a análise do mesmo extrato em concentração baixa e média em machos fora do contexto de acasalamento não tenha sido apresentada no presente trabalho, respostas de alarme têm sido demonstradas com a concentração média em outros trabalhos (Egan et al, 2009; Maximino et al, 2014).

Ademais, os resultados demonstram que a capacidade protetiva do contexto reprodutivo contra a expressão de estresse agudo não é absoluta e está sujeita a um limiar de resposta alto,

pois em altas concentrações de substância de alarme os animais exibem comportamentos antipredatórios.

Por fim, um importante aspecto derivado da apreciação dos resultados obtidos é a contribuição para o cuidado experimental necessário em estudos farmacológicos que envolvam análise dos comportamentos aversivos, de ansiedade e estresse, ou de comportamentos reprodutivos. Uma vez que as categorias comportamentais biológicas interagem entre si modulando-se mutuamente. A produção de vieses é um elemento potencial em pesquisas desta natureza a partir do condicionamento em aquários com gêneros mistos, ou mesmo em sistemas de filtragem comum.

## PERSPECTIVAS

No presente trabalho, os resultados demonstraram a existência da interferência dos sistemas comportamentais reprodutivos sobre os sistemas comportamentais de alarme ou estresse agudo em peixe-zebra. Entretanto, mesmo que a forma cuidadosa de obtenção do extrato de pele possa estabelecer concentrações suficientemente precisas para permitir a comparação das respostas entre os grupos ou, até mesmo, entre diferentes estudos, será importante analisar animais adultos sob as mesmas concentrações, mas sem a preparação pré-corte, para conferir o efeito dos mesmos extratos sem a influência do contexto de acasalamento.

Na continuidade investigativa, é necessário testar a resposta de fêmeas e machos separadamente às diferentes concentrações de extrato de pele, mas analisando-os aos pares já que o animal isolado é induzido ao estresse quando retirado do contexto social, o que é evidenciado para animais que vivem em cardume como o peixe-zebra (Faustino et al 2017). Tal estudo poderia esclarecer se a influência inibitória do contexto reprodutivo sobre a resposta aversiva se deve à ocorrência do comportamento de corte ou apenas à situação hormonal e prontidão reprodutiva dos animais. E para analisar o efeito inibitório do estado reprodutivo sobre a resposta aversiva, será analisada a resposta aversiva sob a presença de  $\text{PGF2}\alpha$ , o feromônio de acasalamento, para conferir se os efeitos observados no presente trabalho podem ser atribuídos à provável liberação de  $\text{PGF2}\alpha$  pelas fêmeas durante a corte. Por sua vez, agregar análises sobre grupos mistos poderia demonstrar a relevância da capacidade tamponante do contexto social sobre os animais sob estresse agudo, correlacionando-os com a exposição à feromônios interespecíficos.

Desta forma, novas análises se somarão a esta pesquisa para esclarecer os diferentes fatores que possam interferir, seja por adaptações ou modulações em níveis periféricos e/ou centrais, e que poderão servir como parâmetros de influências em estudos sobre o comportamento aversivo ou para estudos de ansiedade neste importante modelo animal. As filmagens obtidas serão também analisadas quanto aos itens: o tempo de congelamento, separadamente do número de movimentos erráticos, número de momentos de congelamento, latência para subir à metade superior do aquário, tempo despendido na metade inferior e na superior do aquário. Alguns destes itens, como latência e tempo despendido nas partes do aquário serão avaliados a cada minuto, conforme protocolo de Stewart et al (2011). Além disto, também se torna positiva a inclusão de novos tratamentos estatísticos que possam aprofundar as relações estabelecidas de acordo com a natureza progressiva das administrações de concentrações extrato de pele, levando em conta análises de medida repetida. Soma-se também outras apreciações estatísticas com transformações paramétricas para aprofundar os resultados obtidos na comparação entre os gêneros e as respostas de alarme correspondentes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baerends, G. P., Brouwer, R., Waterbolk, H. T. 1955. Ethological studies on *Lebistes reticulatus* (Peters): I. An analysis of the male courtship pattern. *Behaviour*, 8: 249-334.
- Bateson P.P.G. & Peter H. *Perspectives in Ethology: Volume 7*. Barnes & Noble. 2nd Edition, 2011.
- Berridge, K. C., Robinson, T. E., & Aldridge, J. W. 2009. Dissecting components of reward: 'Liking', 'wanting', and learning. *Current Opinion in Pharmacology*. 9(1), 65-73.
- Biechl D, Tietje K, Ryu S, Grothe B, Gerlach G, Wullimann MF. 2017. Identification of accessory olfactory system and medial amygdala in the zebrafish. *Sci Rep.*, 7: 44295.
- Blanchard RJ, Nikulina JN, Sakai RR, McKittrick C, McEwen B, Blanchard DC. 1998. Behavioral and endocrine change following chronic predatory stress. *Physiol Behav.*, 63(4): 561-9.
- Braford MR Jr. 1995. Comparative aspects of forebrain organization in the rayfined fishes: touchstones or not? *Brain Behav Evol*, 46 (4-5): 259-74.
- Braubach, O.R., Fine, A., Croll, R.P. (2012). Distribution and functional organization of glomeruli in the olfactory bulbs of zebrafish (*Danio rerio*). *J. Comp. Neurol.*, 520: 2317- 2339.
- Brown, G.E., Adrian, J.C., Smyth, E., Leet, H., Brennan, S. 2000. Ostariophysan alarm pheromones: laboratory and field tests of the functional significance of nitrogen oxides. *J. Chem. Ecol.* 26: 139-154.
- Canzian J, Fontana BD, Quadros VA, Rosemberg DB. 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.
- Compagnone, N.A., & Mellon, S.H. 2000. Neurosteroids: Biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front. Neuroendocrinol.*, 21: 1-56.
- Conradsen, C. & McGuigan, K. 2015. Sexually dimorphic morphology and swimming performance relationships in wild-type zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology*, 87: 1219-1233

- Crump, D. R. 1980. Thiethane and dithiolanes from the anal gland of stoat (*Mustela erminea*). *J. Chem. Ecol.*, 6: 341–347.
- Darrow, K.O. & Harris, W.A. 2004. Characterization and development of courtship in zebrafish, *Danio rerio*. *Zebrafish*, 1: 40–45
- De Carvalho TN, Akitake CM, Thisse C, Thisse B, Halpern ME. 2013. Aversive cues fail to activate fos expression in the asymmetric olfactory-habenula pathway of zebrafish. *Front Neural Circuits.*, 7: 98.
- Deng H, Xiao X, Wang Z. 2016. Periaqueductal Gray Neuronal Activities Underlie Different Aspects of Defensive Behaviors. *J Neurosci.* 36: 7580–8
- Døving, K.B., Lastein, S. 2009. The alarm reaction in fishes – odorants, modulations of responses, neural pathways. *Ann N Y Acad Sci.* 1170:413-23.
- Døving, K.B., Selset, R., Thommesen, G. 1980. Olfactory sensitivity to bile acids in salmonid fishes. *Acta Physiol. Scand.*, 108: 123–131.
- Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, Cachat, J.M., Canavello, P.R., Elegante, M.F. 2009. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res.*, 205: 38–44.
- Faustino, AI; Tacão-Monteiro, A.; Oliveira RF. 2017. Mechanisms of social buffering of fear in zebrafish. *Sci. Rep.*, 7: 44329.
- Fujiwara, M., Nitta, A., Chiba, A. 2016. Regulation of sexual odor preference by sex steroids in the posterodorsal medial amygdala in female rats. *Horm Behav.*, 82: 46-55
- Friedrich, R.W. & Korsching, S. I. 1998. Chemotopic, combinatorial, and noncombinatorial odorant representations in the olfactory bulb revealed using a voltage-sensitive axon tracer. *J. Neurosci.*, 18: 9977–9988.
- Friedrich, R.W. & Laurent, G. 2001. Dynamic optimization of odor representations by slow temporal patterning of mitral cell activity. *Science*, 291: 889–894.
- Friedrich, R.W. & Laurent, G. 2004. Dynamics of olfactory bulb input and output activity during odor stimulation in zebrafish. *J. Neurophysiol.*, 91: 2658–2669.

- Gayoso J, Castro A, Anadón R, Manso MJ. 2011. Crypt cells of the zebrafish mainly project to the dorsomedial glomerular field of the olfactory bulb. *Chem Senses*, 37 (4): 357-69.
- Grier H J. 1981. Cellular Organization of the Testis and Spermatogenesis in Fishes. *American Zoologist*, 21 (2): 345-357
- Hamdani, E.H., Stabell, O.B., Alexander, G., Døving, K.B., 2000. Alarm reaction in the crucian carp is mediated by the medial bundle of the medial olfactory tract. *Chem. Senses*, 25: 103–109
- Hansen A & Zielinski BS. 2005. Diversity in the olfactory epithelium of bony fishes: development, lamellar arrangement, sensory neuron cell types and transduction components. *J Neurocytol.*, 34 (3-5):183-208.
- Hein AM, Gil MA, Twomey CR, Couzin ID, Levin SA. 2018. Conserved behavioral circuits govern high-speed decision-making in wild fish shoals. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 115 (48):12224-12228.
- Hikosaka, O. 2010. The habenula: from stress evasion to value-based decision-making. *Nat. Rev. Neurosci.*, 11: 503–513.
- Huszno J. & Klag J. 2012. The reproductive cycle in the male gonads of *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae). Stereological analysis. *Micron*, 43: 666-672.
- Jesuthasan S.J. 2011. Fear, anxiety, and control in the zebrafish. *Dev Neurobiol.*, 72 (3): 395-403.
- Jesuthasan SJ, Mathuru AS. 2008. The alarm response in zebrafish: innate fear in a vertebrate genetic model. *J Neurogenet.*, 22 (3): 211-28.
- Juavinett, A.L., Erlich, J.C., Churchland, A.K. 2018. Decision-making behaviors: weighing ethology, complexity, and sensorimotor compatibility. *Curr Opin Neurobiol.*, 49: 42-50
- Kadohisa M, Wilson DA. 2008. Olfactory Cortical Adaptation Facilitates Detection of Odors Against Background. *J Neurophysiol.*, 95 (3): 1888–1896.
- Kalueff, A.V. 2013. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish.*, 10 (1): 70-86.
- Kavaliers, M., Wiebe, J. P., and Galea, L. A. M. 1994. Reduction of predator odor-induced anxiety in mice by the neurosteroid 3 $\alpha$ hydroxy-4-pregnen-20-one (3 $\alpha$ HP). *Brain Res.*, 645: 325–329.

- Kavaliers M, Choleris E, Colwell DD. 2001. Brief exposure to female odors "emboldens" male mice by reducing predator-induced behavioral and hormonal responses. *Horm Behav.*, 40 (4): 497-509.
- Kermen F, Franco LM, Wyatt C, Yaksi E. 2013. Neural circuits mediating olfactory-driven behavior in fish. *Front. Neural Circuits*, 7: 62.
- Kobayashi, M., Aida, K., Hanyu, I. 1988. Hormone changes during the ovulatory cycle in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 69: 301–307.
- Kobayashi, M., Sorensen, P.W., Stacey, N.E. 2002. Hormonal and pheromonal control of spawning behavior in the goldfish. *Fish Physiol. Biochem.*, 26: 71–84.
- Koide, T., Miyasaka, N., Morimoto, K., Asakawa, K., Urasaki, A., Kawakami, K., Yoshihara Y. 2009. Olfactory neural circuitry for attraction to amino acids revealed by transposon-mediated gene trap approach in zebrafish. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 106: 9884–9889.
- Laale, H. 1977. The biology and use of zebrafish *Brachydanio rerio* in fisheries research: a literature review. *J. Fish Biol.*, 10: 121–173.
- Lastein, S., Höglund, E., Mayer I. Øverli, Ø., Døving, K. B. 2008. Female crucian carp *Carassius carassius* lose predator avoidance when getting ready to mate. *J. Chem. Ecol.* 34: 1487–1491.
- Lebedeva, N.Y., G.A. Malyukina & A.O. Kasumyan.1975. The natural repellent in the skin of Cyprinids.*J. Ichthyol.* 15: 472–480.
- Lecoq J, Tiret P, Charpak S.J. 2009. Peripheral adaptation codes for high odor concentration in glomeruli. *Neurosci.*, 29 (10): 3067-72.
- Lima, S.L.& Dill, L.M. 1990. Behavioral decisions made under the risk of predation—a review and prospectus. *Can. J. Zool.*, 68: 619–640.
- Lima D, Castro LF, Coelho I, Lacerda R, Gesto M, Soares J, André A, Capela R, Torres T, Carvalho AP, Santos MM. 2015. Effects of Tributyltin and Other Retinoid Receptor Agonists in Reproductive-Related Endpoints in the Zebrafish (*Danio rerio*). *J Toxicol Environ Health.* 78 (12): 747-60.
- Lima MG, Silva RX, Silva Sde N, Rodrigues Ldo S, Oliveira KR, Batista Ede J, Maximino C, Herculano AM. 2016. Time-dependent sensitization of stress responses in zebrafish: A putative model for post-traumatic stress disorder. *Behav Processes.*, 128: 70-82

- Luozheng Li, Wenhao Zhang, Yuanyuan Mi, Dahui Wang, Xiaohan Lin, Si Wu. 2016. Dynamical information encoding in neural adaptation. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.*: 3060-3063
- Macoveanu, J.; Henningsson, S.; Pinborg, A. 2016. Sex-Steroid Hormone Manipulation Reduces Brain Response to Reward. *Neuropsychopharmacology*. 41 (4): 1057-65
- Magnhagen, C. 1991. Predation risk as a cost of reproduction. *Trends Ecol. Evolution*, 6: 183–185
- Mahler, S.V., Berridge, K.C. 2012. What and when to "want"? Amygdala-based focusing of incentive salience upon sugar and sex. *Psychopharmacology (Berl.)*, 221 (3): 407-26
- Machluf, Y., Gutnick, A., Levkowitz, G. 2011. Development of the zebrafish hypothalamus. *Ann.N. Y.Acad.Sci.*, 1220: 93–105.
- Matthews M., Varga Z.M., 2012. Anesthesia and Euthanasia in Zebrafish. *ILAR Journal*, 53 (2): 192–204.
- Mathuru, A.S., Kibat, C., Cheong, W.F., Shui, G., Wenk, M.R., Friedrich, R.W., Jesuthasan, S. 2012. Chondroitin fragments are odorants that trigger fear behavior in fish. *Curr Biol.*, 22(6): 538-44.
- Maximino C, da Silva AW, Araújo J, Lima MG, Miranda V, Puty B, Benzecry R, Picanço-Diniz DL, Gouveia A Jr, Oliveira KR, Herculano AM. 2014. Fingerprinting of psychoactive drugs in zebrafish anxiety-like behaviors. *PLoS One*, 9 (7): e103943.
- Mayden, Richard L.; Tang, Kevin L.; Conway, Kevin W.; Freyhof, Jörg; Chamberlain, Sarah; Haskins, Miranda; Schneider, Leah; Sudkamp, Mitchell; Wood Robert M.; Agnew, Mary; Bufalino, Angelo; Sulaiman, Zohrah; Miya, Masaki; Saitoh, Kenji; He, Shunping. 2007. Phylogenetic relationships of *Danio* within the order Cypriniformes: a framework for comparative and evolutionary studies of a model species. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)*. 308 (5): 642–654.
- Miyasaka N, Morimoto K, Tsubokawa T, Higashijima S, Okamoto H, Yoshihara Y. 2009. From the olfactory bulb to higher brain centers: genetic visualization of secondary olfactory pathways in zebrafish. *J Neurosci.*, 29 (15): 4756-67.

- Mori, Kensaku (Ed.)2014. The Olfactory System: From Odor Molecules to Motivational Behaviors. Springer Tokyo, Japan. ISBN 978-4-431-54375-6.
- Nikonov, A.A., Finger, T.E., Caprio, J., 2005. Beyond the olfactory bulb: an odotopic map in the forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102: 18688–18693.
- Northcutt RG. 2006. Connections of the lateral and medial divisions of the goldfish telencephalic pallium. *J Comp Neurol.*, 494 (6): 903–43.
- OECD. 2010. Guidance document on the diagnosis of endocrinerelated histopathology in fsh gonads. OECD series on testing and assessment. No. 123. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
- O’Doherty, J., Cockburn J., Pauli, W. 2017. Learning, Reward, and Decision Making. *Annu Rev Psychol.*, 68: 73–100
- Oliveira, R.F., Silva, J.F., Simoes, J.M. 2011. Fighting zebrafish: Characterization of aggressive behavior and winner-loser effects. *Zebrafish*, 8: 73–81.
- Pankhurst, N.W. 2008. Gonadal steroids: functions and patterns of change. *Fish reproduction*. Enfield, NH: Science Publishers. p. 67–111
- Pfeiffer, W. 1963. Alarm substances. *Experientia*, 19: 1–11.
- Pfeiffer, W. 1977. The distribution of fright reaction and alarm substance cells in fishes. *Copeia*, 4: 653–665.
- Pfeiffer, W., Riegelbauer, G., Meier, G., and Scheibler, B. 1985. Effect of hypoxanthine-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.*, 11: 507–523.
- Quadros VA, Silveira A, Giuliani GS, Didonet F, Silveira AS, Nunes ME, Silva TO, Loro VL, Rosemberg DB. 2016. Strain- and context-dependent behavioural responses of acute alarm substance exposure in zebrafish. *Behav Processes*, 122: 1-11.
- Rehnberg BG, Smith RJ, Bates EH, , Sloley BD, Richardson JS. 1989. Brain benzodiazepine receptors in fathead minnows and the behavioral response to alarm pheromone. *Pharmacol Biochem Behav.*, 33 (2): 435-42

- Sato Y, Miyasaka N, Yoshihara Y. 2005. Mutually exclusive glomerular innervation by two distinct types of olfactory sensory neurons revealed in transgenic zebrafish. *J Neurosci.*, 25 (20): 4889-97.
- Sato Y, Miyasaka N, Yoshihara Y. 2007. Hierarchical regulation of odorant receptor gene choice and subsequent axonal projection of olfactory sensory neurons in zebrafish. *J Neurosci.*, 27 (7): 1606-15.
- Satterlie RA. 2013. Toward an organismal neurobiology: integrative neuroethology. Review. *Integr Comp Biol.*, 53 (2): 183-91.
- Schutz, F. 1956. Vergleichende Untersuchungen über die Schreckreaktion bei Fischen und deren verbreitung. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, 38: 84–135.
- Selman, S., Wallace, R.A., Sarka, A., Qi, X. 1993. Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J. Morphol.*, 218: 203–224.
- Sheldon, R.E. 1912. The olfactory tracts and centers in teleosts. *J. Comp. Neurol.*, 22: 177–339.
- Smith, R. 1973. Testosterone eliminates alarm substance cells in male fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Can. J. Zool.*, 51: 875–876.
- Smith, R, Murphy, B. 1974. Functional morphology of the dorsal pad in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque). *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 103 (1): 65-72.
- Smith, R., McMillan, V. 1974. Agonistic and Reproductive Behaviour of the Fathead Minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque). *Z Tierpsychol.*, 34 (1): 25-58
- Smith, R.J.F. 1976. Seasonal loss of alarm substance in North-american Cyprionoid fishes and its relation to abrasive spawning behavior. *Can. J. Zool.*, 54: 1172–1182.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C. & Smith, C. 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83: 13–34
- Speedie, N., Gerlai, R. 2008. Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res.*, 188 (1): 168-77.
- Stewart A, Wu N, Cachat J, Hart P, Gaikwad S, Wong K, Utterback E, Gilder T, Kyzar E, Newman A, Carlos D, Chang K, Hook M, Rhymes C, Caffery M, Greenberg M, Zadina J,

- Kalueff AV. 2011. Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 35(6):1421-31. Review.
- Tinbergen, N. 1951. The study of instinct. New York, NY, US. Clarendon Press/Oxford University Press.
- Tomizawa, K., Katayama, H., Nakayasu, H. 2001. A novel monoclonal antibody recognizes a previously unknown subdivision of the habenulo-interpeduncular system in zebrafish. *Brain Res.*, 901: 117–127.
- Touhara K. 2002. Odor discrimination by G protein-coupled olfactory receptors. *Microsc Res Tech.*, 58 (3): 135-41.
- Turner KJ1, Hawkins TA, Yáñez J, Anadón R, Wilson SW, Folgueira M., 2016. Afferent Connectivity of the Zebrafish Habenulae. *Front Neural Circuits*, 10: 30.
- Van de Winkel, J.G.J., Van Kuppevelt, T.H.M.S.M., Janssen, H.M.J., Lock, R.A.C. 1986. Glycosaminoglycans in the skin mucus of rainbowtrout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology PartB.*, 85: 473–475.
- Von Bartheld, C.S., Meyer, D.L., Fiebig, E., Ebbesson, S.O. 1984. Central connections of the olfactory bulb in the goldfish, *Carassius auratus*. *Cell Tissue Res*, 238: 475–487.
- Von Frisch, K. 1938. Zur Psychologie des Fisch Schwarmes. *Naturwissenschaften*, 26: 601–606.
- Waldman, B. 1982. Quantitative and Developmental Analyses of the Alarm Reaction in the Zebra Danio, *Brachydanio rerio*. *Copeia*, 1: 1-9.
- Waring C.P., Moore A., Scott A.P. 1996. Milt and endocrine responses of mature male Atlantic salmon (*Salmo salar*) to water-borne testosterone, 17,20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one 20-sulfate, and the urines from adult female and male salmon. *Gen Comp Endocrinol.*, 103: 142-9.
- Westerfield, M. 2000. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). 4th ed., *Univ. of Oregon Press*, Eugene.
- Weth, F., Nadler, W. & Korsching, S. 1996. Nested expression domains for odorant receptors in zebrafish olfactory epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 93(23),13321-13326.
- Woolley CS, Schwartzkroin PA. 1998. Hormonal effects on the brain. *Epilepsia*. 39 Suppl 8:S2-8. Review.

- Yabuki, Y., Koide, T., Miyasaka, N., Wakisaka, N., Masuda, M., Ohkura, M. 2016. Olfactory receptor for prostaglandin F2 $\alpha$  mediates male fish courtship behavior. *Nat Neurosci.*, 19 (7): 897-904.
- Yaksi E, Friedrich RW, Judkewitz B, Wiechert MT. 2009. Processing of odor representations by neuronal circuits in the olfactory bulb. *Ann N Y Acad Sci.*, 1170:293-7.
- Yoder WM, LaRue AK, Rosen JM, Aggarwal S, Shukla RM, Monir J, Smith DW. 2014. Evidence of rapid recovery from perceptual odor adaptation using a new stimulus paradigm. *Atten Percept Psychophys.*, 76 (4): 1093-105.
- Ziani PR, Müller TE, Stefanello FV, Fontana BD, Duarte T, Canzian J, Rosemberg DB. 2018. Nicotine increases fear responses and brain acetylcholinesterase activity in a context-dependent manner in zebrafish. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 170:36-43.
- Zufall, F & Leinders-Zufall, T. 2000. The cellular and molecular basis of odor adaptation. *Chem Senses*, 25 (4): 473-81.

Tabela A. Dados referentes ao Grupo 1. Tempos descritos em segundos para cada categoria de observações. Dados descritos para fêmeas e machos. (Legenda: M, Machos; F, Fêmeas).

Tempo de Córte	Tempo de alarme - Dose Baixa		Tempo de alarme - Dose Média		Tempo de alarme - Dose Alta		Tempo Total de Alarme	
	M1	F1	M1	F1	M1	F1	M1	F1
1590	1590	123	262	0	0	0	123	262
974	974	84	127	78	198	20	182	607
214	214	61	532	23	412	55	139	1051
1066	1066	59	456	30	356	28	117	1107
1578	1578	0	0	0	0	0	0	362
126	126	59	103	130	152	69	258	353
252	252	74	148	0	74	0	74	519
1233	1233	11	45	0	0	93	104	45
1196	1196	0	0	0	0	0	0	0

Tabela B. Dados referentes ao Grupo 2, Controles. Tempos descritos em segundos. (Legenda: CM, Controles Machos; CF, Controles Fêmeas).

Tempo de Corte	Tempo de Alarme - Veículo			Tempo de Alarme - Veículo			Tempo de Alarme - Veículo			Tempo total de Alarme		
	CM1	CF1	CM1	CF1	CM1	CF1	CM1	CF1	CM1	CF1	CM1	CF1
CM1	894	894	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CM2	1102	1102	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CM3	1238	1238	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CM4	317	317	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CM5	298	298	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CM6	1327	1327	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CM7	1081	1081	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CM8	1355	1355	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CM9	1022	1022	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela C. Dados Referente ao Grupo 3, Dose Média Única. Tempos descritos em segundos. (Legenda: DUMM, Dose Única Média Macho; DUMF, Dose Única Média Fêmea).

Tempo de Côrte		Tempo de Alarme - Macho		Tempo de Alarme - Fêmea	
DUMM1	DUMF1	DUMM1	DUMF1	DUMM1	DUMF1
1123	1123	49	118	49	118
DUMM2	DUMF2	DUMM2	DUMF2	DUMM2	DUMF2
1359	1359	66	145	66	145
DUMM3	DUMF3	DUMM3	DUMF3	DUMM3	DUMF3
544	544	98	299	98	299
DUMM4	DUMF4	DMM4	DUMF4	DUMM4	DUMF4
890	890	73	191	73	191
DUMM5	DUMF5	DMM5	DUMF5	DUMM5	DUMF5
1488	1488	41	78	41	78
DUMM6	DUMF6	DUMM6	DUMF6	DUMM6	DUMF6
1268	1268	62	134	62	134
DUMM7	DUMF7	DUMM7	DUMF7	DUMM7	DUMF7
487	487	102	312	102	312
DUMM8	DUMF8	DUMM8	DUMF8	DUMM8	DUMF8
1053	1053	110	287	110	287
DUMM9	DUMF9	DUMM9	DUMF9	DUMM9	DUMF9
1623	1623	88	213	88	213
DUMM10	DUMF10	DUMM10	DUMF10	DUMM10	DUMF10
799	799	66	132	66	132
DUMM11	DUMF11	DUMM11	DUMF11	DUMM11	DUMF11
1281	1281	84	179	84	179
DUMM12	DUMF12	DUMM12	DUMF12	DUMM12	DUMF12
1544	1544	55	117	55	117
DUMM13	DUMF13	DUMM13	DUMF13	DUMM13	DUMF13
1119	1119	61	125	61	125

Tabela D. Dados referentes ao Grupo 4, Dose Alta Única. Tempos descritos em segundos. (Legenda: DUAM, Dose Única Alta Machos; DUAF, Dose Única Alta Fêmeas).

Tempo de Côrte		Tempo de Alarme - Machos		Tempo de Alarme - Fêmeas	
DUAM1	DUAF1	DUAM1	DUAF1		
1203	1203	85	430		
DUAM2	DUAF2	DUAM2	DUAF2		
855	855	114	557		
DUAM3	DUAF3	DUAM3	DUAF3		
510	510	141	520		
DUAM4	DUAF4	DUAM4	DUAF4		
998	998	162	341		
DUAM5	DUAF5	DUAM5	DUAF5		
1622	1622	151	228		
DUAM6	DUAF6	DUAM6	DUAF6		
489	489	193	439		
DUAM7	DUAF7	DUAM7	DUAF7		
532	532	177	312		
DUAM8	DUAF8	DUAM8	DUAF8		
1481	1481	71	246		
DUAM9	DUAF9	DUAM9	DUAF9		
1532	1532	89	282		



U F R G S

UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



## CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 34542

Título: AVALIACAO DA ATIVIDADE DAS VIAS DE PROCESSAMENTO OLFATORIO POR ODORANTES DE ALARME E REPRODUTIVO EM DANIO RERIO (PEIXE-ZEBRA)

Vigência: 22/02/2018 à 31/08/2019

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

DENISE MARIA ZANCAN - coordenador desde 22/02/2018

LUCIANO STURMER DE FRAGA - coordenador desde 22/02/2018

Fabrício do Couto Nicola - pesquisador desde 22/02/2018

ENEIDA DE OLIVEIRA CABRAL ROCHA - Aluno de Mestrado desde 22/02/2018

***Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 44 peixes-zebra (Danio rerio) selvagens no estágio juvenil (42 dias de vida) e 112 adultos jovens (90 dias de vida), de ambos os sexos, provenientes da colônia a partir de cruzamentos entre animais adquiridos do Departamento de Bioquímica da UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.***

Porto Alegre, Sexta-Feira, 25 de Maio de 2018

MARCELO MELLER ALIEVI  
Coordenador da comissão de ética