



LUCIANA CREPALDI LUNKES

**EFEITOS DA MELATONINA SOBRE OS PARÂMETROS
BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS EM ZEBRAFISH
(*Danio rerio*) SUBMETIDOS AO ESTRESSE AGUDO E
CRÔNICO**

LAVRAS - MG

2018

LUCIANA CREPALDI LUNKES

**EFEITOS DA MELATONINA SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E
COMPORTAMENTAIS EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*) SUBMETIDOS AO ESTRESSE
AGUDO E CRÔNICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

Dr. Luis David Solis Murgas

Orientador

Dr. André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna

Coorientador

LAVRAS - MG

2018

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Lunkes, Luciana Crepaldi.

Efeitos da melatonina sobre os parâmetros bioquímicos e comportamentais em zebrafish (*Danio rerio*) submetidos ao estresse agudo e crônico / Luciana Crepaldi Lunkes. - 2018.

109 p.

Orientador(a): Luis David Solis Murgas.

Coorientador(a): André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Zebrafish. 2. Estresse. 3. Melatonina. I. Murgas, Luis David Solis. II. Vianna, André Rodrigues da Cunha Barreto. III. Título.

LUCIANA CREPALDI LUNKES

**EFEITOS DA MELATONINA SOBRE OS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E
COMPORTAMENTAIS EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*) SUBMETIDOS AO ESTRESSE
AGUDO E CRÔNICO**

*EFFECTS OF MELATONIN ON BIOCHEMICAL AND BEHAVIORAL PARAMETERS IN
ZEBRAFISH (*Danio rerio*) SUBMITTED TO ACUTE AND CHRONIC STRESS*

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 17 de dezembro de 2018.

Dra. Alessandra de Castro Souza	UNILAVRAS
Dra. Grazielle Caroline da Silva	UNILAVRAS
Dra. Cristina Delarete Drummond	UFLA
Dr. André Rodrigues da Cunha Barreto Vianna	UFLA

Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

LAVRAS - MG

2018

Ao meu exemplo, verdadeiro motivo de tudo, maior e melhor amor de toda a minha vida, meu pai Érico (in memoriam), grande incentivador, merecedor de todo meu reconhecimento e gratidão diante de qualquer conquista.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Olha só, pai! Agora sua filha vai ser doutora! E isso não significa nada perto de tudo que você me ensinou nas disciplinas obrigatórias da vida, nos experimentos do dia-a-dia, nas análises estatísticas do coração. Onde quer que você esteja, pela ligação que temos, sei que esse sentimento tão nobre que você fez questão de me ensinar o valor – a gratidão –, vai chegar até você. Obrigada por ser tudo que eu tenho de mais importante. Esse nosso amor de alma ultrapassa qualquer dimensão de tempo e espaço, e por isso, todos os dias me esforço para ser alguém melhor, pois sei que você continua me acompanhando e sentindo orgulho da sua filhinha professora.

Agradeço muito àquele que jamais hesitou em estar comigo nos bastidores desse doutorado, definitivamente os momentos mais difíceis. Meu irmão Rodrigo, companheiro de vida, obrigada por me mostrar o quanto nós dois podemos ser mais fortes juntos. Sempre e incondicionalmente juntos.

Aos meus tios Christiane e Argenta, serei eternamente grata por todo acolhimento e amor, não somente, mas especialmente durante essa fase. À minha prima-irmã-amiga Anna Caroline, agradeço pela parceria de sempre e por todo o carinho, assim como ao primo quase irmão Luiz Felipe.

Acreditando verdadeiramente que amigos são escolhas da alma, agradeço por tudo à Juliana, minha irmã, agora mais pertinho. À Isadora, por dividir muitas das responsabilidades comigo das mais diversas formas, e principalmente por sempre se fazer presente nos meus melhores (e piores) momentos.

De forma especial, agradeço imensamente ao meu professor e orientador Luis Murgas. Sempre tive certeza da sua grandiosa humanidade. Obrigada por me deixar livre para entender e acreditar que é possível chegar a lugares onde jamais imaginei. Você é e sempre será para mim um grande exemplo de professor, pesquisador, pai e ser humano.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Medicina Veterinária e ao Programa de Pós graduação em Ciências Veterinárias, agradeço pela oportunidade. E também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Rede Mineira de Bioterismo pelo apoio financeiro na execução dos experimentos.

À Isadora Marques, quem desde o início desenvolveu comigo toda a ideia desse projeto, executando processos e compartilhando angústias ao longo de todas as fases, meus

infinitos agradecimentos. À Gilmara, agradeço pela parceria e amizade. Aos demais colegas do Biotério Central e membros do NEPAD, deixo também o meu muito obrigada.

Em especial, agradeço muito às amigas Renata e Isabela. Uma das melhores partes desse doutorado foi poder descobrir o quanto somos melhores juntas em qualquer situação, a qualquer distância, em qualquer fuso horário. Obrigada por serem vocês e por estarem na minha vida.

Agradeço também ao querido amigo Wesley, sempre tão disponível e atencioso, junto aos professores do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pela parceria e colaboração nas análises dos resultados dos experimentos.

Aos professores membros da banca, meu muito obrigada pela grandiosa contribuição. Agradeço especialmente ao professor André Vianna pela coorientação, pela amizade, por todo apoio e disponibilidade, por nunca hesitar em me auxiliar a qualquer momento, em todos os desesperos. Você e seus admiráveis valores profissionais e pessoais tornaram-se grandes exemplos pra mim.

A todos os meus alunos do Centro Universitário de Lavras (Unilavras), agradeço pela inspiração diária e por toda paciência e compreensão ao longo desses anos. Grande parte do que fui, sou e pretendo ser é por vocês. Agradeço também aos meus colegas e amigos do curso de Fisioterapia e da Direção e Coordenação, que tanto me energizaram e fortaleceram no decorrer de todos os desafios.

“Eu não sou o que me aconteceu. Eu sou o que escolho me tornar.”

Carl G. Jung

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros hematológicos, hormonais (cortisol), enzimáticos e comportamentais de *zebrafish* que receberam administração de melatonina e foram submetidos ao estresse agudo e crônico. 240 *zebrafish wild-type* foram divididos em cinco grupos: controle naïve (N), controle negativo (C-), controle positivo tratado com diazepam (C+), tratamento com melatonina na dose 1 (Melt. 1) e tratamento com melatonina na dose 2 (Melt. 2). A exposição aos tratamentos nos grupos C+ (0,16mg/l de diazepam), Melt. 1 (6800 nM) e Melt. 2 (13600 nM) foi realizada previamente aos protocolos de estresse. O estresse agudo foi desencadeado através da perseguição com a rede por 5 minutos seguida pela exposição ao ar por 1 minuto, e no estresse crônico foram conduzidas diferentes fontes estressoras em diferentes horários ao longo de oito dias. Foram contabilizadas as células de defesa sanguínea, quantificada a atividade enzimática e mensurados os níveis de cortisol corporal, bem como o estresse oxidativo (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS, espécies reativas de oxigênio – ROS, e atividade antioxidante – SOD e CAT). Todos os animais foram submetidos ao teste de campo aberto. A melatonina foi capaz de modular os efeitos do estresse agudo em *zebrafish* promovendo linfocitose, inibindo o aumento dos níveis de cortisol, reduzindo os parâmetros locomotores em geral, induzindo um estado de sono, reduzindo a peroxidação lipídica e estimulando a atividade enzimática antioxidante. No estresse crônico, a exposição ao diazepam promoveu efeitos em animais estressados associados ao perfil hematológico (trombocitopenia), à redução dos níveis de TBARS e ao aumento da atividade da SOD. A exposição crônica à melatonina nas duas concentrações reduziu os níveis de TBARS e promoveu aumento no estado de atividade e atividade locomotora.

Palavras-chave: Peixe. Indolamina. Comportamento. Ansiedade. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate hematological, hormonal (cortisol), enzymatic, and behavioral parameters of zebrafish subjected to melatonin administration followed by acute or chronic stress. Wild type zebrafish were divided into five groups: naïve control (N), negative control (C-), positive control treated with diazepam (C+), melatonin treatment dose 1 (Melt. 1), and melatonin treatment dose 2 (Melt. 2). Exposure to treatments in groups C+ (0.16 mg/L diazepam), Melt. 1 (6800 nM) and Melt. 2 (13600 nM) was performed prior to stress protocols. Acute stress was unleashed by the chase with a net for 5 minutes followed by exposure to the air for 1 minute, and the chronic protocol was performed in which different stress sources were carried at different times during 8 days. Blood cells were counted, enzyme activity were quantified and body cortisol levels were measured, as well as oxidative stress parameters (substances reactive to thiobarbituric acid – TBARS, reactive oxygen species – ROS, and antioxidant activity – SOD and CAT). For behavioral analysis, all animals were subjected to the open field test. Melatonin was able to modulate acute stress effects on zebrafish by promoting lymphocytosis, inhibiting the increase of cortisol levels, reducing locomotor parameters, inducing a state of sleep, reducing lipid peroxidation, and stimulating antioxidant enzymatic activity. In fish chronically stressed, exposure to diazepam promoted effects associated with hematological profile (thrombocytopenia), reduction of TBARS levels and increased SOD activity. Chronic exposure to melatonin at both concentrations reduced TBARS levels and promoted an increase in activity status and locomotor activity.

Keywords: Fish. Indolamine. Behavior. Anxiety. Oxidative stress.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	12
1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	<i>Zebrafish</i>: o modelo animal em estudo	14
2.2	O conceito de estresse em peixes	17
2.2.1	<i>Eustress</i> versus <i>Distress</i> e a adaptação fisiológica	21
2.2.2	As respostas primária, secundária e terciária: sistema endócrino, alterações teciduais e efeitos duradouros	22
2.3	Ritmos biológicos: a natureza dos processos regulatórios	31
2.3.1	A glândula pineal em peixes	32
2.4	O hormônio melatonina	33
2.4.1	Biossíntese e regulação da melatonina	34
2.4.2	O órgão pineal, a retina e o cérebro	37
2.4.3	Efeitos da melatonina em peixes	38
2.5	Parâmetros bioquímicos e hematológicos associados ao estresse: metodologias para análise do nível de cortisol corporal, atividade enzimática e contagem de células sanguíneas em <i>zebrafish</i> adulto	41
2.6	O <i>zebrafish</i> como modelo para estudos comportamentais: parâmetros e protocolos em animais adultos	45
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
	REFERÊNCIAS	51
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	62
	ARTIGO 1 – O PAPEL DA MELATONINA NA MODULAÇÃO DO ESTRESSE AGUDO EM ZEBRAFISH (<i>Danio rerio</i>)	62
	ARTIGO 2 – EXPOSIÇÃO CRÔNICA À MELATONINA E AO DIAZEPAM EM ZEBRAFISH (<i>Danio rerio</i>) SUBMETIDOS AO ESTRESSE	88

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Em peixes, estudos envolvendo modelos de estresse e suas consequências vem sendo desenvolvidos ao longo do tempo (BARTON, 2002; BIRNIE-GAUVIN et al., 2017; CHENG et al., 2015; GESTO et al., 2015; LUSHCHAK, 2011; MANUEL et al., 2014; SONG et al., 2018). Por tratar-se de uma situação de desequilíbrio homeostático, e principalmente por gerar consequências muitas vezes irreversíveis, busca-se cada vez mais mecanismos capazes de prevenir as circunstâncias associadas ao estresse (MARCON et al., 2018a; RAMBO et al., 2017). Associado a isso, a melatonina, um hormônio produzido pela glândula pineal conhecido como um importante regulador do ritmo biológico, tem se destacado por outros diversos efeitos, como a redução do estresse oxidativo, ação antioxidante, papel antiestresse, indução da maturação ovocitária e mobilização de reservas de gordura (DIAS et al., 2017; ESTEBAN et al., 2013; FALCÓN et al., 2010; FENG; BASS, 2014; LIMA-CABELLO et al., 2014; MAITRA; HASAN, 2016; VIELMA et al., 2014; WAI et al., 2014), apesar de ainda não estarem totalmente esclarecidos na literatura.

O *zebrafish* (*Danio rerio*), também conhecido no Brasil como peixe-zebra ou paulistinha, é um teleosteo de água doce originário do sudoeste da Ásia, pertencente à família *Cyprinidae*. Trata-se de um peixe de pequeno porte, facilmente adaptável para criação em cativeiro por ser muito ativo, curioso e bastante pacífico, normalmente encontrado em cardumes de 10 animais. O animal adulto (90 dias) mede cerca de 3-4 cm, e é fenotipicamente caracterizado pela alternância de listras claras e escuras, apresentando dimorfismo sexual marcante. As fêmeas possuem alta taxa de produção de ovos (aproximadamente 200/desova), provenientes de fecundação externa, resultando em embriões translúcidos com rápido desenvolvimento, o que permite acompanhar sua evolução com facilidade (KHAN et al., 2017; NOWIK et al., 2015; SIEBEL; BONAN; SILVA, 2015).

O estudo do genoma do *zebrafish* foi concluído (HOWE et al., 2013) e sua comparação a um genoma de referência humano mostrou que 70% dos genes humanos possuem ao menos um ortólogo de *zebrafish*. Além disso, destes, 84% associam-se de forma semelhante a doenças humanas. Por essas razões, o *zebrafish* mostrou-se um vertebrado amplamente promissor para o desenvolvimento de pesquisas científicas nas mais diversas áreas, incluindo mecanismos básicos de desenvolvimento, fisiologia, genética, toxicologia, reprodução, câncer, células-tronco, síndromes e doenças, imunologia e infecção, visão,

regeneração, comportamento, entre muitas outras.

A factível relação entre o desenvolvimento de mamíferos e do *zebrafish* sugere também uma conservação entre comportamentos, inclusive nas alterações do seu controle frente a diversas situações, o que justifica a utilização do animal e o valida como modelo para estudos comportamentais. Nesse sentido, uma considerável quantidade de ferramentas surge com o objetivo de embasar as pesquisas envolvendo processos específicos do desenvolvimento biológico e patologias em vertebrados.

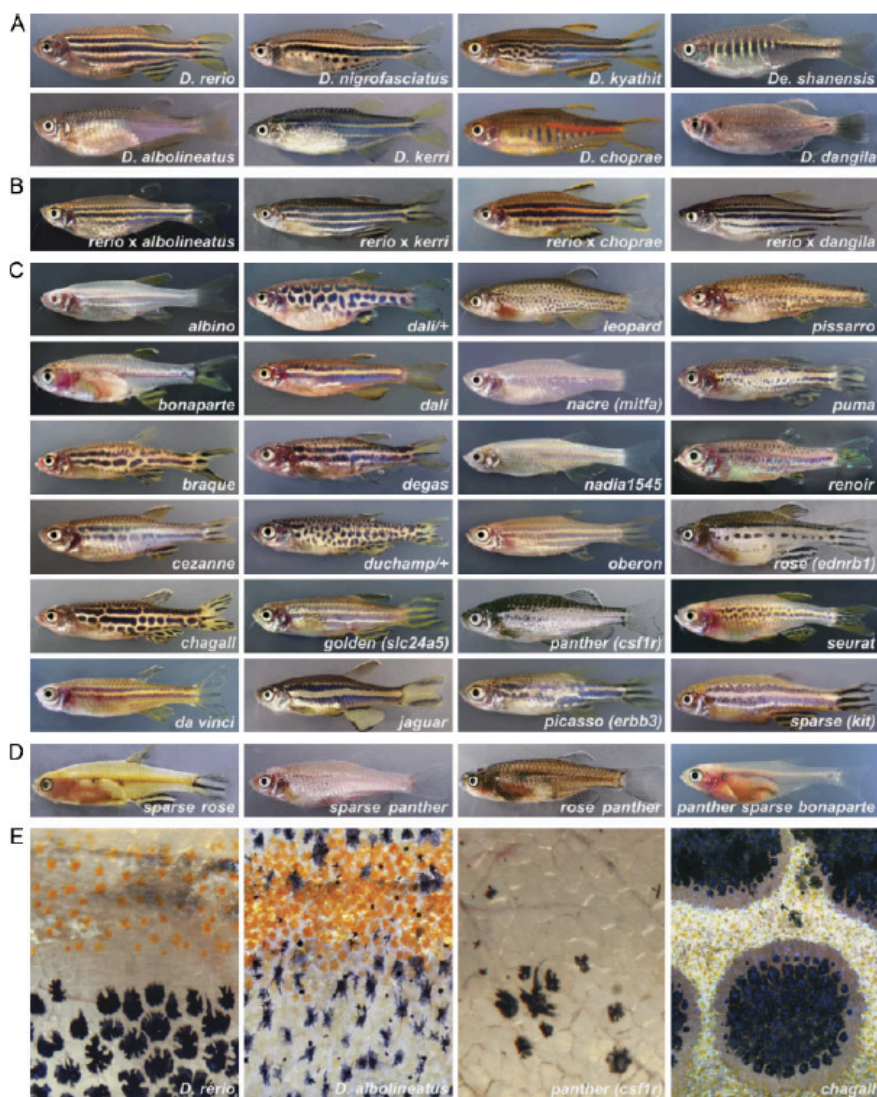
Considerando todas as características que contribuem para a ascensão do *zebrafish* no cenário da pesquisa científica básica, bem como a necessidade de estudos envolvendo modelos de estresse e a elucidação dos mecanismos associados às ações hormonais, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo geral de verificar os possíveis efeitos da melatonina associados a variáveis bioquímicas e comportamentais em *zebrafish* (*Danio rerio*) submetidos ao estresse agudo ou crônico. Além de contribuir para a validação da espécie como modelo experimental no estresse, este estudo fornecerá bases científicas para futuras investigações.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Zebrafish*: o modelo animal em estudo

O *zebrafish* (*Danio rerio*) é um animal vertebrado aquático de pequeno porte, conhecido como um modelo amplamente utilizado em pesquisas nas áreas biomédicas e biologia comparativa e evolutiva, caracterizado dentro de uma grande diversidade de espécies e mutações (FIGURA 1). O nome *Danio* deriva do bangla “*dhani*”, que significa “do campo de arroz”, considerando que o *zebrafish* é comumente encontrado em colunas de água em locais onde se pratica o cultivo de arroz (ARUNACHALAM et al., 2013).

Figura 1 – Diversidade dos padrões de pigmento *Danio*.

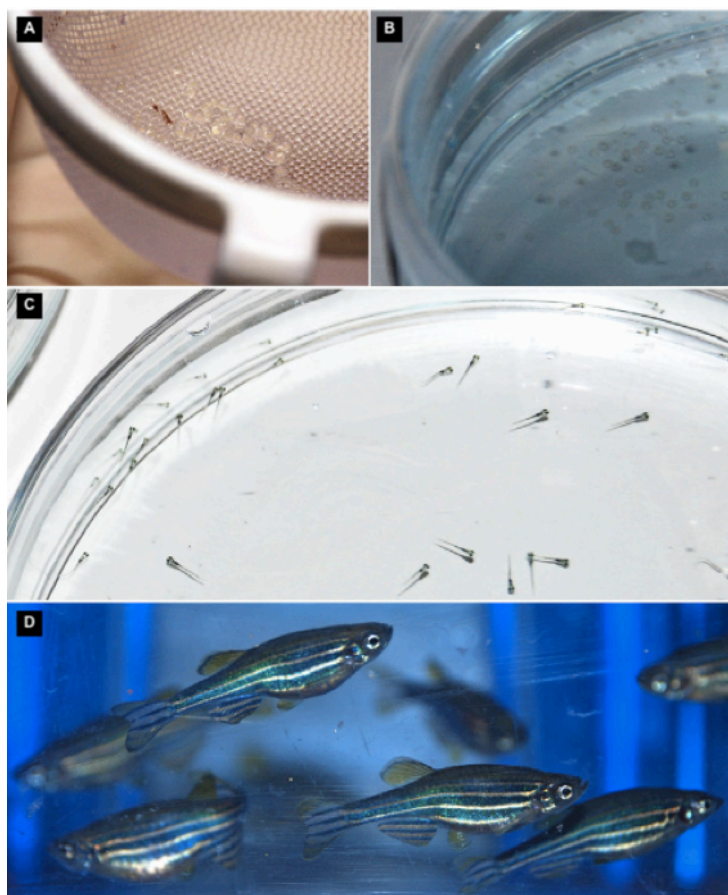


Legenda: A-D: Características típicas das hibridizações entre as espécies *Danio* e *Devario*; E: Detalhes dos padrões de pigmentos em diferentes espécies e origens mutantes.

Fonte: Adaptado de Parichy (2007).

No Brasil, a prática adotada pela comunidade científica em utilizar o *zebrafish* como modelo animal nos experimentos vem refletindo na quantidade de trabalhos publicados, principalmente a partir dos anos 1990 (GHENO et al., 2016). Devido sua alta capacidade de absorção de compostos adicionados à água, seu acelerado metabolismo e sua sensibilidade a químicos, o *zebrafish* (FIGURA 2) é favorável como modelo para estudos toxicológicos (YANG et al., 2009), genéticos, teratológicos (BECKER; BECKER, 2008), farmacológicos (BENCAN; SLEDGE; LEVIN, 2009; EGAN et al., 2009), neurocomportamentais (MATHUR; GUO, 2010; SISON; GERLAI, 2011) e para desvendar mecanismos de diversas doenças humanas, além de testes para novos agentes terapêuticos (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012).

Figura 2 – Imagens representativas dos estágios de desenvolvimento do *zebrafish*.



Legenda: Estágios embrionário (A; B), larval (C) e adulto (D).

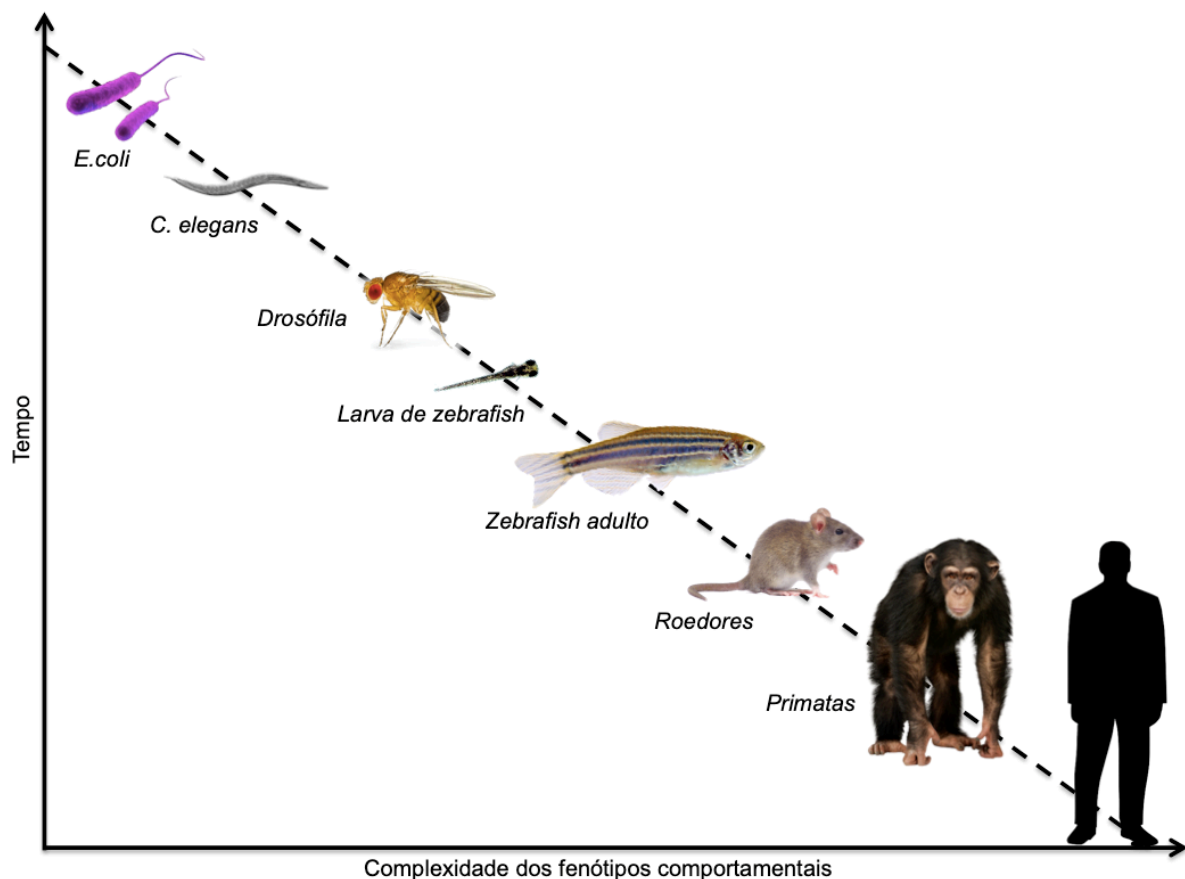
Fonte: Adaptado de Vaz; Outeiro; Ferreira (2018).

Quando comparado a outros modelos mais comumente utilizados no meio experimental, como a drosófila e o camundongo (FIGURA 3), o *zebrafish* apresenta

vantagens, como seus embriões translúcidos provenientes de fecundação externa, grande capacidade reprodutiva (cerca de 200 ovos/fêmea/dia), curto tempo para atingir a idade adulta (60-90 dias) e baixo custo de manutenção diária. Outro fator inclui a possibilidade da sua utilização como modelo para testes dos mais diversos compostos, como drogas e tóxicos, em diversos animais simultaneamente expostos diretamente na água (KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014; SIEBEL; BONAN; SILVA, 2015).

Ultimamente, o *zebrafish* vem sendo caracterizado como excelente modelo para o estudo do desenvolvimento hematopoiético (GORE et al., 2018), neuropsicofarmacologia e descoberta de drogas envolvendo o sistema nervoso central (KHAN et al., 2017), escoliose idiopática (BOSWELL; CIRUNA, 2017), investigação e identificação de mecanismos patogênicos e alvos terapêuticos em doenças raras (ADAMSON; SHERIDAN; GRIERSON, 2018), estados afetivos, como a depressão (ABREU et al., 2018), estudo de sistemas centrais de opioides e endocanabinoides (DEMIN et al., 2018) e doenças como obesidade e diabetes (MONTALBANO et al., 2018; ZANG; MADDISON; CHEN, 2018).

Figura 2 – Complexidade dos fenótipos comportamentais, do início ao fim, envolvendo os principais animais utilizados como modelo nas pesquisas das áreas biomédicas.



Fonte: Do autor (2018).

Além da ascensão do *zebrafish* no meio experimental envolvendo estudos genéticos e da biologia do desenvolvimento, a utilização dessa espécie como modelo para pesquisas na área de neurociências e neurobiologia do comportamento vem se destacando ao longo dos últimos anos (SIEBEL; BONAN; SILVA, 2015). Isso contribuiu para a compreensão da neuropatogênese das doenças e para a possibilidade de triagem de novos medicamentos, como nas doenças de Alzheimer e de Parkinson. Neste sentido, diversos estudos envolvendo os parâmetros comportamentais em *zebrafish*, incluindo memória e aprendizado, medo, atividade locomotora, entre outros, vem sendo desenvolvidos. Assim, o *zebrafish* tem sido muito utilizado em diversos campos específicos de pesquisa para avaliar seu repertório comportamental na compreensão de muitos fenômenos, como ansiedade e respostas ao estresse, indicando sua utilidade como uma ferramenta de pesquisa robusta e quantificável (DAMETTO et al., 2018; STEWART et al., 2011).

Mais recentemente, o *zebrafish* tem sido utilizado em pesquisas associadas a insuficiência cardíaca, incluindo triagem rápida e avaliação da eficácia de medicamentos preventivos e terapêuticos (ZHU et al., 2018), compreensão de mecanismos infecciosos, como na tuberculose ocular (TAKAKI; RAMAKRISHNAN; BASU, 2018) e na produção de anticorpos contra opioides, facilitando sua utilização como modelo para doenças imunes (ARÉVALO et al., 2018). Além disso, no entendimento das consequências do estresse envolvendo efeitos comportamentais e fisiológicos (SONG et al., 2018) e da síntese de melatonina e regulação através de genes no órgão pineal comparados a mamíferos (SAHA et al., 2018).

2.2 O conceito de estresse em peixes

O termo estresse é utilizado sempre que um organismo é submetido a uma situação desafiadora que pode resultar em perigo para sua integridade, descrito por uma série de eventos que representam ameaça e desencadeiam respostas fisiológicas e comportamentais adicionais àquelas já impostas pelo ciclo de vida do animal, objetivando reestabelecer a homeostasia através de mecanismos de luta ou fuga (MCEWEN; WINGFIELD, 2003; SCHRECK, 2010; TORT, 2011). Dependendo da magnitude e da duração do estresse, todos os níveis de organização, desde molecular e bioquímico até o populacional, podem ser afetados.

O estresse é definido por uma resposta fisiológica do organismo, enquanto uma variável ambiental que causa essa resposta é definida como estressor. Trata-se de uma cascata de eventos que ocorrem quando o organismo está tentando resistir à morte ou reestabelecer a homeostasia frente a uma ameaça (SCHRECK; TORT, 2016). Os estressores podem variar de muito breves (agudos) – por exemplo, perseguição com rede ou predador – até prolongados ou permanentes (crônicos) – por exemplo, superlotação ou hierarquia social. No entanto, os conceitos “agudo” e “crônico” referem-se muito mais à duração das consequências sobre a fisiologia do animal (BOONSTRA, 2013).

A resposta ao estresse é iniciada imediatamente após a percepção de um estressor. Determinadas situações levemente estressantes podem ter efeitos benéficos ou positivos, enquanto situações mais severas e duradouras induzem respostas adaptativas e possíveis consequências negativas. Existe uma variação considerável em como os peixes respondem a um estressor, fator associado ao contexto ambiental em que o peixe está inserido e sua condição fisiológica momentânea (SCHRECK; TORT, 2016). Em situações de estresse agudo, em geral, os níveis de cortisol aumentados fazem com que a atividade locomotora do animal aumente, principalmente durante a primeira hora. Após 48 horas, diante de uma situação de estresse já considerada crônica, a locomoção e a agressividade normalmente diminuem (ØVERLI; KOTZIAN; WINBERG, 2002).

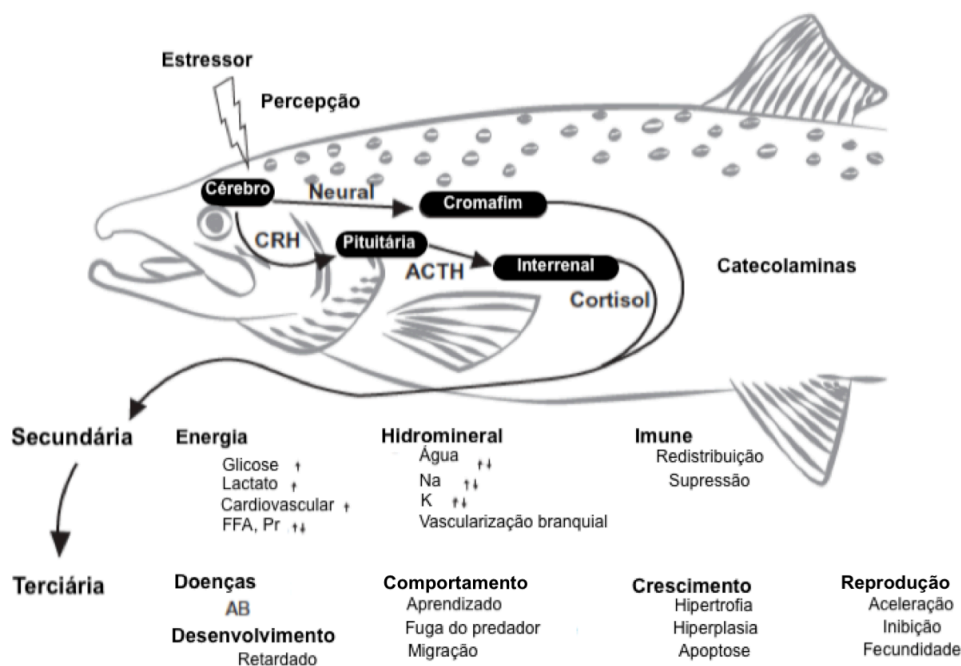
Inicialmente, as respostas fisiológicas dos peixes ao estresse foram agrupadas por Barton (2002). Primariamente, caracterizam-se pela atuação neuroendócrina e consequente liberação de catecolaminas, além da estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal, culminando na liberação de corticosteroides. As respostas secundárias incluem alterações a níveis iônicos e metabólitos no plasma e nos tecidos, características hematológicas e proteínas de estresse. De acordo com Lima et al. (2006), tudo isso está relacionado aos ajustes fisiológicos associados a realocação energética no intuito de restaurar o equilíbrio, tais como respiração, estado ácido-básico, equilíbrio hidromineral, função imunológica e respostas celulares. Ademais, também ocorrem as respostas terciárias, que se referem a aspectos como mudanças no crescimento, alimentação, resistência a doenças, atividade locomotora e comportamental, além da sobrevivência (LIMA et al., 2006).

O estresse também pode ser definido como uma síndrome geral de adaptação, caracterizado por respostas associadas a três diferentes estágios: o primeiro, chamado de reação de alarme, onde ocorre a resposta inicial ao estímulo, na tentativa do animal em compensar o distúrbio através da regulação dos sistemas envolvidos no processo de fuga, enfrentamento e adaptação; o segundo, conhecido por resistência, onde o peixe supera o

estressor suficientemente a ponto de reestabelecer sua homeostasia, permitindo uma recuperação compensatória, ou inicia uma trajetória que pode acabar levando à morte; e o terceiro, designado exaustão, que é quando a exposição a um estressor ultrapassa em duração e severidade os limites do animal, culminando, na maioria das vezes, na morte, ou, quando o animal sobrevive, em uma situação patológica (OBA; MARIANO; SANTOS, 2009; SCHRECK; TORT, 2016; SELYE, 1950, 1973).

Uma vez posta em movimento, a resposta ao estresse é regulada por vários processos, à medida que o peixe tenta restaurar um equilíbrio homeostático (mecanismos de *feedback* negativo envolvendo fatores endócrinos; respostas celulares através de *up* ou *down regulation* dos receptores; efeitos hormonais e regulação proteica/enzimática) (FIGURA 4). Em geral, um estressor pode ser classificado como algo que prepara o organismo para agir, promovendo respostas. Sua duração pode incluir segundos a minutos, dias, semanas e até meses. Assim, as respostas adaptativas do animal também podem variar em termos de magnitude e duração (SCHRECK; TORT, 2016). Estressores potenciais para peixes incluem a alteração de temperatura, fotoperíodo (luminosidade), qualidade da água, pH, oxigênio disponível, suprimento alimentar insuficiente, predação e exposição a toxinas e sons, isolamento e perseguição (BARTON, 2002; CHENG et al., 2015; HAN et al., 2016; PAVLIDIS; THEODORIDI; TSALAFOUTA, 2015; SONG et al., 2018; TORT, 2011).

Figura 4 – Respostas primárias, secundárias e terciárias dos peixes frente a uma situação de estresse.



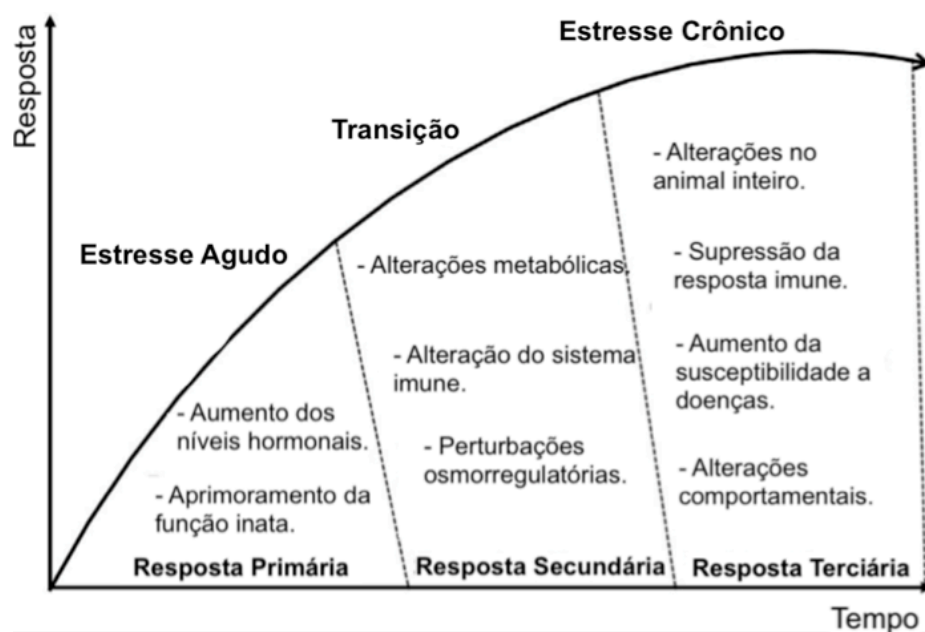
Legenda: CRH, hormônio liberador de corticotropina; ACTH, hormônio adrenocorticotrófico; FFA, ácidos graxos livres; Pr, proteínas; AB, anticorpos.

Fonte: Adaptado de Schreck; Tort (2016).

Nesse sentido, os mecanismos gerais de resposta ao estresse envolvem uma cascata de sinalização desencadeada pela ativação de circuitos neurais no sistema nervoso central (SNC), associados a estruturas corticais, límbicas e hipotalâmicas (resposta primária) (BARTON, 2002). Nessa resposta, o hipotálamo é o modulador central do estresse, e as catecolaminas, o hormônio liberador de corticosteroides (CRH), o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e os glicocorticoides são mediadores neuroendócrinos essenciais para essa ativação (PACÁK et al., 1998; TURNBULL; RIVIER, 1999).

Se o estresse é prolongado no tempo (FIGURA 5), as vias ativadas geram alterações nas funções metabólicas e celulares, distúrbios osmorregulatórios e alterações na função imunológica (resposta secundária). Especificamente em peixes, o equilíbrio dinâmico é constantemente ameaçado por estressores intrínsecos e extrínsecos. Por exemplo, altas densidades, habitats não naturais e situações sociais incomuns, como o manuseio frequente, transporte, alimentação excessiva e qualidade da água abaixo do ideal (temperaturas variáveis, produtos residuais, produtos químicos e poluentes ambientais) podem gerar uma sobrecarga alostática que afeta o comportamento normal e a fisiologia em indivíduos suscetíveis.

Figura 5 – Os estressores percebidos agem no sistema nervoso central dos peixes causando respostas fisiológicas primárias (agudas), secundárias (transição) e terciárias (animal inteiro, crônicas).



Fonte: Adaptado de Nardocci et al. (2014).

Todos os estressores podem desencadear um estresse crônico nesses indivíduos e podem causar um estado de anorexia, alterações nos padrões locomotores e aumentos nos níveis de cortisol no plasma e nos níveis de serotonina no cérebro (SORENSEN et al., 2011, 2012). Estas respostas podem desencadear um atraso no crescimento e uma consequente redução no tamanho do peixe, o que acabaria por levar a um menor teor de proteína. Essas mudanças tardias no animal inteiro são conhecidas como resposta terciária.

2.2.1 *Eustress* versus *Distress* e a adaptação fisiológica

A título de reconhecimento da resposta dos peixes de forma adequada frente a vários estressores e durações é necessário descrever os conceitos de “*eustress*” e “*distress*”. Após uma quebra inicial do estado de homeostase, podem ser geradas respostas adaptativas que induzem processos biológicos compensatórios (SCHRECK, 2010). No sistema imune, por exemplo, baixos níveis de estresse resultam em níveis ligeiramente elevados de cortisol, que tem um efeito positivo sobre a capacidade imunológica, aumentando a regulação da leucócitos, a imunidade inata, a função das células efectoras e a imunidade mediada por células, promovendo maior resistência a infecções e tumores. Esse nível positivo de estresse é referido como “*eustress*” (DHABHAR, 2008; SCHRECK, 2010). Portanto, essa resposta ao estresse que resulta no retorno oportuno às condições de pré-esforço e na restauração dos regulamentos homeostáticos evidencia que nem todo estresse é ruim (GORISSEN; FLIK, 2016).

À medida que a gravidade de um estressor aumenta e os hormônios como o cortisol ficam um pouco mais elevados, o sistema imunológico oscila num estado em que os efeitos positivos começam a desaparecer, dando lugar aos negativos. Seguindo a gravidade do estressor, aumenta-se a supressão de todos os fatores imunológicos, bem como a resistência. Esse estado de estresse em que os efeitos são negativos é chamado de “*distress*” (SCHRECK; TORT, 2016). Nesse sentido, quando o estressor se torna crônico, o cortisol não restaura as condições de pré-esforço. Se a resposta endócrina não resultar em uma recuperação oportuna, a regulação homeostática permanece perturbada e patologias poderão surgir (GORISSEN; FLIK, 2016).

Em virtude da duração e da magnitude do estresse, o animal responderá de forma diferente. No geral, a adaptação fisiológica caracteriza-se pela soma de mecanismos que permitem ao organismo superar o desafio colocado pelo estressor, adequando-se e recuperando-se, podendo envolver respostas compensatórias e/ou habituação. Isso associa-se

a todos os tipos de resposta fisiológica, incluindo mecanismos energéticos, respostas imunológicas e estratégias de aprendizado e enfrentamento. Quando os recursos não são suficientes para superar o estressor, ou a reação não é capaz de controlá-lo, ocorre a chamada não adaptação. Os peixes, como outros vertebrados, possuem várias habilidades e mecanismos para lidar com estímulos estressores e superar suas consequências. Vale ressaltar que a reação depende do tipo de estressor, sua intensidade e sua eventual repetição. No entanto, a falta de controle e a imprevisibilidade sempre dificultarão muito as possibilidades de enfrentamento, pois em tais condições a carga alostática aumentará (KORTE; OLIVIER; KOOLHAAS, 2007; SCHRECK, 2010).

É essencial ressaltar que a ação adrenérgica frente a uma situação de estresse caracteriza uma resposta propriamente dita, pois a adrenalina é a responsável pela liberação imediata de energia no processo de luta ou fuga do animal (SELYE, 1950, 1973). Em seguida, o cortisol assume o processo adaptativo: distribuição de energia e reestabelecimento das condições pré-esforço, incluindo ajustes homeostáticos, como na osmorregulação e na alimentação (KOOLHAAS et al., 2011; KORTE; OLIVIER; KOOLHAAS, 2007). Eventualmente, um equilíbrio energético adequado é o que regula o estresse.

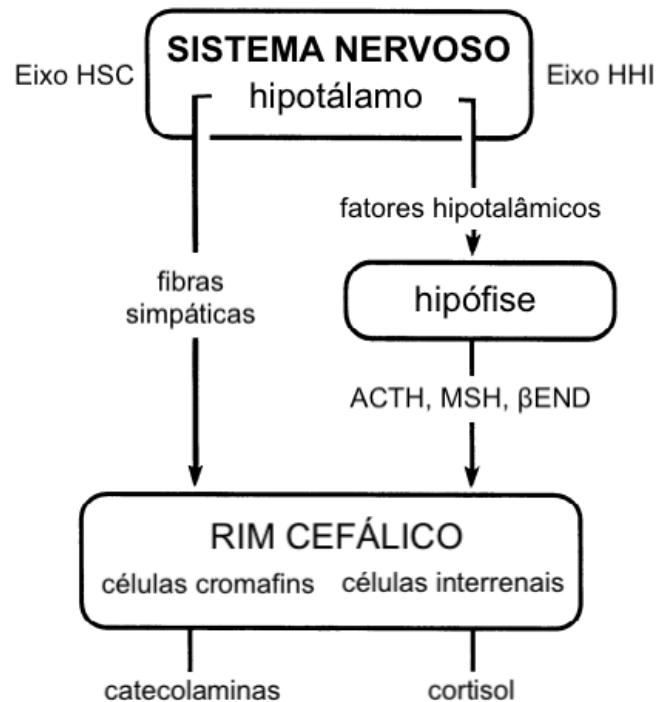
Para compreender a resposta ao estresse de um vertebrado é essencial desvendar os complexos comportamentos associados. Adequadamente, segue-se uma resposta a medida em que memória, aprendizado, avaliação e previsão são suficientemente capazes de lidar com um ambiente dinâmico, requerendo estruturas cerebrais que facilitem tais comportamentos (SCHRECK; TORT, 2016). A biologia moderna tem avançado nas pesquisas com modelos vertebrados, principalmente o *zebrafish*, amplamente utilizado na compreensão do estresse (CORTÉS et al., 2018; MARCON et al., 2018b; PANCOTTO et al., 2018) devido sua semelhança genética e fisiológica com seres humanos (HOWE et al., 2013).

2.2.2 As respostas primária, secundária e terciária: sistema endócrino, alterações teciduais e efeitos duradouros

Um organismo que lida com desafios ambientais precisa adequar-se às condições estressantes para garantir sua sobrevivência. Dessa forma, a complexidade do sistema endócrino fornece a mediação química de todo o processo através da integração de sinais hipotalâmicos, onde suas respostas fazem com que a distribuição energética seja adequada para as reações de luta ou fuga (GORISSEN; FLIK, 2016). Sempre que um peixe é exposto a um agente estressor, dois eixos neuroendócrinos são ativados (FIGURA 6): o hipotálamo-

sistema nervoso simpático-células cromafins (HSC), que resulta na liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina); e o hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI), que libera os corticosteroides (cortisol e cortisona) (OBA; MARIANO; SANTOS, 2009; WENDELAAR BONGA, 1997).

Figura 6 – Diagrama dos principais elementos neuroendócrinos envolvidos na integração da resposta ao estresse em teleósteos.



Legenda: ACTH: hormônio adenocorticotrófico; MSH: hormônio melanócito estimulante; βEND: β-endorfina.

Fonte: Adaptado de Wendelaar Bonga (1997).

As primeiras reações a um evento estressor baseiam-se na detecção pelo organismo de uma situação de risco, informação que é enviada para o sistema nervoso central no hipotálamo, centro de integração do cérebro. Diversas vias simpáticas seguem até o tecido cromafim no rim cefálico, especificamente nas células cromafins (homólogas da medula suprarrenal em mamíferos). Através desse estímulo, a adrenalina e a noradrenalina (catecolaminas) são liberadas na corrente sanguínea (OBA; MARIANO; SANTOS, 2009; SILVEIRA; LOGATO; PONTES, 2009).

A liberação desses hormônios ocorre sempre que o organismo vertebrado requer um acréscimo no transporte de oxigênio do sangue, bem como na mobilização de substratos de energia (LIMA et al., 2006; WENDELAAR BONGA, 1997). Em situações de estresse, as concentrações de glicose sanguínea nos peixes aumentam rapidamente como mecanismo

fisiológico de defesa, uma vez que o organismo se prepara para uma fuga ou combate, necessitando de uma fonte de energia de fácil metabolização e imediata utilização. As principais responsáveis pela hiperglicemia em teleósteos estressados são as catecolaminas adrenalina e noradrenalina (BARTON; IWAMA, 1991).

Os níveis de catecolaminas podem ser elevados rapidamente (entre 1 a 3 minutos), persistindo por algumas horas. Em peixes, a epinefrina (adrenalina) é a catecolamina predominante. Seus efeitos secundários envolvem alterações, principalmente, nos sistemas respiratório e cardiovascular – aumento da taxa ventilatória e da captação de oxigênio (O₂) pelas brânquias, aumento do fluxo sanguíneo branquial e da capacidade de difusão e transporte de O₂ pelo sangue (WENDELAAR BONGA, 1997; BARTON; IWAMA, 1991).

O estresse agudo (captura, manejo, transporte, hipóxia, mudança brusca de temperatura) resulta em um rápido aumento dos níveis de lactato plasmático e muscular, diminuição do pH, e da concentração de O₂ sanguíneo. Portanto, essa resposta endócrina inicial induz diversos ajustes metabólicos, incluindo alterações nos níveis plasmáticos de glicose e eletrólitos. Nesse sentido, as catecolaminas também estimulam a glicogenólise, induzindo a hidrólise de glicogênio no fígado, traduzindo uma hiperglicemia, diminuição da proteína muscular e aumento dos batimentos cardíacos (SILVEIRA; LOGATO; PONTES, 2009; TAVARES-DIAS, 2009; WENDELAAR BONGA, 1997). Também existem evidências do envolvimento das catecolaminas na mobilização dos ácidos graxos livres, fontes importantes de energia para os peixes (LIMA et al., 2006; PICKERING; POTTINGER, 1995). Por isso, no estresse crônico, podem haver perdas de peso mas evidentes.

Os neuropeptídeos são conhecidos como fatores liberadores de corticotrofinas (CRFs). Seu transporte é realizado a partir do hipotálamo para a hipófise, onde ocorre o estímulo para que o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) seja produzido e secretado, processo mediado pelo hormônio melanócito estimulante (α MSH) e pela β -endorfina. Além dessa via clássica, outros mediadores podem agir, como o peptídeo urotensina-1, de estrutura parecida e mesma função que o CRF no eixo HHI, que é produzido pela urófise, um sistema neuroendócrino único em peixes gnatostomados, possuindo papel significativo quando o peixe é exposto a estressores osmóticos, não estando envolvido em respostas inespecíficas de estresse (WENDELAAR BONGA, 1997). Quando o ACTH é liberado na corrente sanguínea e chega até as células interrenais (homólogas do córtex suprarrenal em mamíferos), também localizadas no rim cefálico, estimula a liberação de corticosteroides, produzidos a partir do colesterol (ØVERLI et al., 2007).

Na maioria dos peixes, o principal corticosteroide é o cortisol, tendo seus níveis circulantes aumentados no plasma sanguíneo rapidamente após a exposição a um estressor. Por isso, o cortisol plasmático é o indicador de estresse mais largamente utilizado em peixes, qualquer que seja o seu estágio de desenvolvimento. Valer ressaltar que grande parte do cortisol no sangue circula ligado à proteínas transportadoras, portanto, a simples liberação do hormônio não significa um aumento dos seus efeitos. Além disso, o cortisol pode interagir com diversos hormônios, o que torna ainda mais ampla a lista de alvos de regulação (MOMMSEN; VIJAYAN; MOON, 1999).

Em peixes, existe um *feedback* que controla a liberação do cortisol, onde altos níveis circulantes promovem uma retroalimentação negativa na produção e liberação de ACTH pela hipófise. O cortisol também pode apresentar *feedback* sobre o hipotálamo e influenciar a liberação dos CRFs, interações comandadas pelo eixo HHI (LIMA et al., 2006; OBA; MARIANO; SANTOS, 2009; ØVERLI et al., 2007).

Em peixes, os órgãos-alvo do cortisol são, prioritariamente, as brânquias, o intestino e o fígado. É nesse órgãos que as principais atuações desse hormônio se refletem: o balanço hidromineral e o metabolismo energético, sendo compatível às ações da aldosterona e de glicocorticoides (cortisol ou corticosterona) que ocorrem nos vertebrados terrestres (LIMA et al., 2006; WENDELAAR BONGA, 1997). Por ser um esteroide lipossolúvel, o cortisol tem a capacidade de difundir passivamente entre as células, podendo ligar-se a um receptor, sendo ativado, metabolizado ou inativado. O cortisol liga-se ao seu receptor no citosol e o heterocomplexo GR-ligante transloca-se até o núcleo, onde forma um homodímero e se liga ao elemento de resposta do promotor de genes com resposta a corticoides; desta forma, pode modular a transativação ou a transrepressão de genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo, reprodução e função imune. O papel do cortisol também envolve o controle pela ligação a proteínas de membrana associadas a sinalizações genômicas e não-genômicas (ALURU; VIJAYAN, 2009).

Em peixes teleósteos o cortisol apresenta funções mineralocorticoides (estimulação da captação ou eliminação de íons como Na^+ e Cl^-) e glicocorticoides (metabolismo de substratos energéticos), além de promover a diferenciação de células-cloreto nas brânquias, envolvidas no transporte iônico e atividade mitocondrial. Após a elevação dos níveis de cortisol, a glicemia pode aumentar, diminuir ou permanecer inalterada. Esta mesma variação ocorre nos estoques de glicogênio hepático. O cortisol pode aumentar a glicogenólise, provendo glicose como fonte de energia, e também pode estimular a produção de glicose hepática (gliconeogênese), além do aumento dos níveis de ácidos graxos livres (lipólise).

Portanto, a ação glicocorticoide do cortisol em peixes é mais direcionada à gliconeogênese e à manutenção das reservas energéticas a longo prazo do que à mobilização energética a curto prazo promovida pela glicólise. Também atua no sistema imunológico e na reação inflamatória em peixes, promovendo imunossupressão, diminuindo a produção de interleucinas e reduzindo a mobilização de leucócitos, inibindo a formação de ácido araquidônico e diminuindo a síntese de prostaglandinas, suprimindo a indução da inflamação. Portanto, esse hormônio age nas duas vias: disponibilizando combustível para lidar com a situação de estresse e restaurando as reservas para recuperação após o estímulo (MOMMSEN; VIJAYAN; MOON, 1999; OBA; MARIANO; SANTOS, 2009; PICKERING; POTTINGER, 1995; WENDELAAR BONGA, 1997).

As concentrações de cortisol no plasma variam nas diferentes espécies de peixes. Normalmente, quando o animal é exposto a um estressor agudo, os níveis de cortisol aumentam em poucos minutos, atingem um pico, e retornam aos níveis basais em até 6-24 horas (BARTON; IWAMA, 1991; OBA; MARIANO; SANTOS, 2009; PICKERING; POTTINGER, 1995).

Quando o estressor é crônico, as concentrações de cortisol podem permanecer elevadas, mas normalmente ficam abaixo dos níveis máximos (WENDELAAR BONGA, 1997). O perfil de cortisol circulante pode variar em concentrações basais médias de acordo com a divergência na especificidade dos métodos de análise, pelas diferentes condições de criação dos peixes, por procedimentos de captura e mesmo por fatores naturais e biológicos (BARTON; IWAMA, 1991).

Além disso, fatores como a temperatura da água, salinidade do ambiente, migração, estágio de maturação gonadal e estado nutricional podem influenciar o perfil de resposta ao estresse associado ao pico de cortisol, nem sempre caracterizando efeitos negativos. Ademais, a resposta do animal ao hormônio pode ser afetada por qualquer um dos fatores que regulam sua disponibilidade, tais como proteínas de ligação, receptores nos tecidos alvo, captação pelos tecidos e catabolismo do hormônio. No sentido oposto, a ausência de níveis elevados de cortisol não necessariamente está relacionada à ausência do estresse, como nos casos de estresse crônico envolvendo níveis mais baixos dificilmente diferenciados do repouso, porém, com sérias implicações na depressão do sistema imunológico e na resistência a doenças (LIMA et al., 2006; MOMMSEN; VIJAYAN; MOON, 1999; WENDELAAR BONGA, 1997).

Portanto, quando o peixe é exposto a estressores continuamente, o nível de cortisol plasmático se mantém elevado por dias ou semanas, podendo levar até mesmo a uma redução

em número ou na sensibilidade dos receptores de cortisol nos tecidos, refletindo nas respostas apresentadas frente a outros agentes estressores (JOBLING, 1994; OBA; MARIANO; SANTOS, 2009). Dessa forma, estresse e o cortisol podem agir de forma hormética, onde um desafio leve, mas capaz de ativar o eixo HHI, parece ser benéfico, enquanto um estresse mais acentuado pode trazer consequências negativas (SCHRECK, 2010).

A resposta secundária pode ser classificada como uma fase de resistência e tentativa de adaptação, resultante do aumento dos níveis circulatórios de catecolaminas e cortisol. Usualmente, é definida como a canalização das ações e dos efeitos imediatos desses hormônios em nível sanguíneo e de tecidos, incluindo o aumento dos batimentos cardíacos e da absorção de oxigênio, e a mobilização de substratos de energia e, ainda, a perturbação do balanço hidromineral. Ocorrem diversas alterações, principalmente bioquímicas e fisiológicas.

Os principais efeitos metabólicos incluem hiperglicemia, hiperlactacemia, depleção das reservas glicogênicas, lipólise e inibição da síntese proteica, bem como catabolismo de proteínas musculares e alterações nos níveis plasmáticos de aminoácidos, ácidos graxos livres e colesterol, além da depleção das reservas de ácido ascórbico, particularmente do tecido interrenal (LIMA et al., 2006; OBA; MARIANO; SANTOS, 2009; PICKERING; POTTINGER, 1995). Em geral, as catecolaminas causam o aumento dos níveis de glicose no plasma pela mobilização das reservas de glicogênio hepático, enquanto os corticosteroides mantêm a hiperglicemia estimulando o catabolismo proteico e a gliconeogênese.

No estresse, distúrbios osmóticos e iônicos podem ocorrer como resultado da diurese e da perda de eletrólitos sanguíneos, onde os níveis de adrenalina podem induzir o aumento da permeabilidade do epitélio branquial à passagem da água. Também podem ocorrer mudanças hematológicas, tanto nos eritrócitos quanto nos leucócitos (leucopenia). O estresse causa hemodiluição ou hemoconcentração em muitas espécies de peixes teleósteos, alterando valores de hematócritos (normalmente diminuem), além de outros parâmetros (OBA; MARIANO; SANTOS, 2009; SILVEIRA; LOGATO; PONTES, 2009). Em *zebrafish*, por exemplo, animais estressados agudamente apresentam leucograma com linfopenia, monocitose e neutrofilia, enquanto aqueles estressados cronicamente apresentam linfopenia e monocitose, sem mudanças significativas nos neutrófilos (GRZELAK et al., 2017).

Durante o período de recuperação do estresse, na tentativa do peixe de recuperar o equilíbrio osmótico e iônico, as catecolaminas influenciam grandemente o sistema cardiovascular – alterações no fluxo de sangue, aumento na perfusão branquial, alteração na capacidade de transporte de oxigênio –, enquanto os corticosteroides estimulam os

mecanismo de transporte iônico presentes nas brânquias e nos rins – distúrbios osmóticos e iônicos levam ao decréscimo da osmolaridade em peixes de água doce. A exposição dos peixes aos diferentes estressores ambientais pode levar ao aumento de sua susceptibilidade aos agentes infecciosos e parasitários (OBA; MARIANO; SANTOS, 2009; SILVEIRA; LOGATO; PONTES, 2009; TAVARES-DIAS, 2009).

A resposta terciária ocorre numa fase de exaustão do organismo, quando a exposição a agentes estressores torna-se crônica. Essa resposta manifesta-se a nível populacional, onde a capacidade de adaptação do organismo é excedida e ocorrem alterações na função imune e na resistência natural dos peixes a doenças e agentes infecciosos, bem como mudanças na taxa de crescimento e reprodução.

A limitação da capacidade do animal de tolerar estressores subsequentes ou adicionais também é atribuída a uma manifestação da resposta terciária, já que a própria resposta de estresse pode ser afetada por eventos anteriores. O tecido interrenal de peixes estressados é menos sensível ao ACTH do que o de peixes não estressados, e assim, eventos estressantes contínuos podem impedir que o animal lide com uma nova situação de estresse, situação preocupante considerando a rotina de eventos diária (LIMA et al., 2006; MOMMSEN; VIJAYAN; MOON, 1999; SILVEIRA; LOGATO; PONTES, 2009).

Uma série de alterações patológicas podem ser induzidas pela exposição crônica a agentes estressores. Essas alterações incluem o insucesso reprodutivo, a diminuição da taxa de crescimento e a imunossupressão. Em algumas espécies de peixes isso pode ocorrer devido à supressão do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, resultando na redução dos níveis dos hormônios sexuais (GTH, testosterona, estradiol), causando uma falha reprodutiva, e também na mortalidade de ovos e larvas, bem como alteração da resposta comportamental da progênie (JOBILING, 1994; OBA; MARIANO; SANTOS, 2009).

Outra resposta bastante notável de um peixe cronicamente exposto a um estressor é a disrupção do comportamento alimentar, através da cessação da alimentação. Normalmente, esse aspecto vem acompanhado pelos efeitos catabólicos das catecolaminas e dos corticoides sobre as reservas energéticas dos tecidos corporais, reduzindo, conseqüentemente, o crescimento dos animais estressados (OBA; MARIANO; SANTOS, 2009; SILVEIRA; LOGATO; PONTES, 2009). O cortisol exerce um efeito sobre a síntese proteica, e isso pode ser utilizado como indicador de crescimento somático. Catecolaminas e cortisol inibem o crescimento somático pois também estimulam o consumo de energia, a gliconeogênese e a lipólise. Além disso, o hormônio do crescimento (GH) aumenta o apetite e a eficiência na conversão do alimento, e sua secreção, dependente da hipófise, é inibida pelo cortisol em

situações de estresse em peixes (SILVEIRA; LOGATO; PONTES, 2009; WENDELAAR BONGA, 1997).

O hormônio do crescimento (GH) é liberado na corrente sanguínea pela hipófise, sendo controlado por dois hormônios secretados pelo hipotálamo: o hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH), que exerce função estimuladora, e a somatostatina (SST), com ação inibidora. O GH estimula a produção e liberação de IGF-1 (*insulin-like growth factor*), que afeta a divisão e a diferenciação celular. A insulina, produzida pelo pâncreas, possui efeitos promotores do crescimento, podendo tanto reagir com receptores de IGF-1, quanto otimizar a produção de IGF-1, através da modulação da afinidade dos receptores hepáticos do GH. Os hormônios tireoidianos, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) estão envolvidos no processo de crescimento somático, apresentando efeitos na secreção de GH e na resposta celular ao IGF-1.

O cortisol, especificamente, pode atuar de diversas formas influenciando o crescimento, atuando através do retardo do crescimento tecidual e da proliferação celular, interferindo na agressão intraespecífica (e, portanto, na disponibilidade de alimento para os indivíduos do grupo), na captação de nutrientes pelo intestino e na saciedade. Apesar de ser conhecido como um hormônio osmorregulador, o cortisol também pode alterar esse parâmetro, induzindo a apoptose por seus níveis cronicamente elevados (MOMMSEN; VIJAYAN; MOON, 1999; WENDELAAR BONGA, 1997).

Uma das formas da ação inibitória sobre o crescimento dá-se através dos níveis plasmáticos de T3 e T4, direta ou indiretamente, pela alteração nutricional causada pela redução na quantidade de ingestão de alimento induzida pelo estresse. De forma geral, quando o peixe é exposto a agentes estressores, os níveis mais altos da organização biológica são afetados, como a razão dos ácidos nucleicos (RNA:DNA), que é influenciada diretamente pelo jejum e pela restrição alimentar (JOBLING, 1994; OBA; MARIANO; SANTOS, 2009).

Em relação ao sistema imune, quando o estressor é agudo e uma resposta de curto prazo é estimulada, a resposta imune do peixe baseia-se em aumentar a função inata, resultando no aumento no número de leucócitos circulantes. Esse fenômeno está relacionado à ativação do sistema nervoso simpático e à liberação de catecolaminas, que mobilizam tanto os eritrócitos quanto os leucócitos. Se o estressor é crônico, a resposta imune é suprimida, e isso aumenta a possibilidade de infecção. Acredita-se que os efeitos nocivos do estresse sobre a resposta imune sejam preferencialmente mediados pelos efeitos supressores dos glicocorticoides (cortisol) e são uma consequência da incapacidade de adaptação. Vale

ressaltar que o hormônio do crescimento, os opioides e os hormônios da tireoide também afetam as respostas imunes (NARDOCCI et al., 2014).

O quadro 1 resume os principais hormônios e suas funções associadas a uma situação de estresse, descritos por Wendelaar Bonga (1997).

Quadro 1 – Principais hormônios envolvidos e suas funções associadas durante a resposta ao estresse em peixes.

Hormônio	Secreção	Principal função durante o estresse
Catecolaminas	Células cromafins	Inibe o equilíbrio hidromineral e a liberação do glicogênio hepático; estimula a liberação de glicose no plasma, o aumento do débito cardíaco, o fluxo de sangue, difusão e captação de oxigênio nas brânquias; influencia a liberação de ácidos graxos livres e as funções do sistema imune
Cortisol	Células interrenais	Inibe a síntese proteica muscular, as funções do sistema imune, o crescimento e a reprodução; estimula o equilíbrio hidromineral, a liberação do glicogênio hepático e a liberação de ácidos graxos livres (lipólise)
Hormônio liberador de corticotrofinas (CRF)	Hipotálamo	Estimula a síntese e a secreção do ACTH
Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH)	Hipófise	Estimula a síntese e a secreção do cortisol
Hormônio melanócito estimulante (α MSH) e β -endorfina	Hipófise	Níveis aumentados durante o processo de adaptação ao estresse
Urotensina-1	Urófise	Estimula a síntese e a secreção do ACTH
Arginina-vasotocina (AVT)	Hipotálamo	Estimula a síntese e a secreção do ACTH; Antidiurético
Hormônio concentrador de melanóforos (MCH)	Hipotálamo	Estimula a secreção do α MSH na hipófise (POMC) e a nível de célula-alvo
Hormônio do crescimento (GH)	Hipófise	Estimula o crescimento e o controle hidromineral
Prolactina	Hipófise	Controle inibitório da permeabilidade à água e aos íons
Somatolactina	Hipófise	Associada a maturação e desova, equilíbrio hidromineral e ácido e mobilização de energia
Hormônio gonadotrófico (GTH)	Hipófise	Altera o desenvolvimento gonadal, a gametogênese/espermatogênese e a maturação

Fonte: Adaptado de Wendelaar Bonga (1997).

2.3 Ritmos biológicos: a natureza dos processos regulatórios

Denomina-se ritmo biológico qualquer evento que se repita de maneira regular em um organismo. A ritmicidade circadiana no comportamento e no metabolismo trata-se de um fenômeno onipresente na biologia, documentado em espécies tão diversas como organismos unicelulares, plantas, invertebrados e vertebrados (MORGAN, 2004; VERAS et al., 2013). Neste sentido, muitos dos processos fisiológicos e comportamentais expressos pelos organismos vivos de forma definida em cada espécie são considerados rítmicos, e suas ocorrências giram em torno de uma periodicidade de 24 horas (ritmo circadiano), como é o caso dos peixes.

Ritmos diários em peixes enfatizam o comportamento locomotor, reprodutivo e alimentar, além de fatores neuroendócrinos envolvendo a secreção de hormônios. De acordo com Falcón et al. (2010), sinalizadores externos como luminosidade, temperatura, disponibilidade de alimento, chuva e salinidade da água, quando variam, fazem com que a maioria dos organismos adapte seu comportamento de forma reativa. Em *zebrafish*, o ritmo circadiano é considerado uma das mais importantes características das respostas comportamentais, principalmente quando relacionado com a avaliação do estresse ambiental (YANG et al., 2018).

Um sistema circadiano compreende todos os diferentes componentes pelos quais a luz entra no organismo e é transformada em um sinal nervoso ou hormonal cronometrado. Em contraste com os mamíferos, o sistema circadiano de teleósteos mostra uma flexibilidade impressionante, pois mesmas espécies de peixes podem apresentar comportamento diurno ou noturno, podendo alternar de acordo com a estação do ano ou ao longo de seu desenvolvimento (FALCÓN et al., 2010; IDDA et al., 2012).

A melatonina é uma das principais formas de transmissão de informações do relógio circadiano para o organismo nos vertebrados. Nos mamíferos, a informação fótica é percebida pelos olhos e transmitida através do trato retino-hipotalâmico para os núcleos supraquiasmáticos (NSQs) do hipotálamo, onde residem os relógios mestres; a partir daí, uma via multissináptica conecta os NSQs à glândula pineal, uma das responsáveis pela produção de melatonina (FALCÓN et al., 2007, 2007, 2010; SIMONNEAUX, 2003).

Nos peixes, a glândula pineal e a retina ocupam uma posição central na organização circadiana. A glândula pineal é composta por células fotorreceptoras que estimulam a síntese e a secreção da melatonina, também denominada como “relógio autônomo”. Então, todo o processo é mediado por um sistema neuroendócrino composto por sensores e osciladores

circadianos (glândula pineal, olhos laterais e NSQs do hipotálamo) (FALCÓN et al., 2010; MAITRA et al., 2013; SAHA et al., 2018).

2.3.1 A glândula pineal em peixes

A pineal em peixes teleósteos é uma glândula neuroendócrina localizada logo abaixo do crânio, formada como uma vesícula terminal conectada ao diencéfalo por um pedúnculo pineal. A região do crânio que recobre a glândula geralmente é mais fina, e a pele é menos pigmentada no intuito de facilitar a penetração da luz (EKSTRÖM; MEISSL, 1997).

Existem três tipos de células na glândula pineal: os pinealócitos, as células nervosas e as células intersticiais. Os pinealócitos são o local de produção da informação neural e hormonal da glândula pineal. Ambas as vias de saída mostram ritmicidade (EKSTRÖM; MEISSL, 1997; FALCÓN et al., 2001). São células fotorreceptoras, que convertem sinais luminosos em sinais elétricos. Em resposta à escuridão, essas células são despolarizadas e liberam neurotransmissores, como glutamato e aspartato. Isso ativa as células nervosas e, portanto, a informação fotoperiódica é enviada ao cérebro através de uma transmissão nervosa.

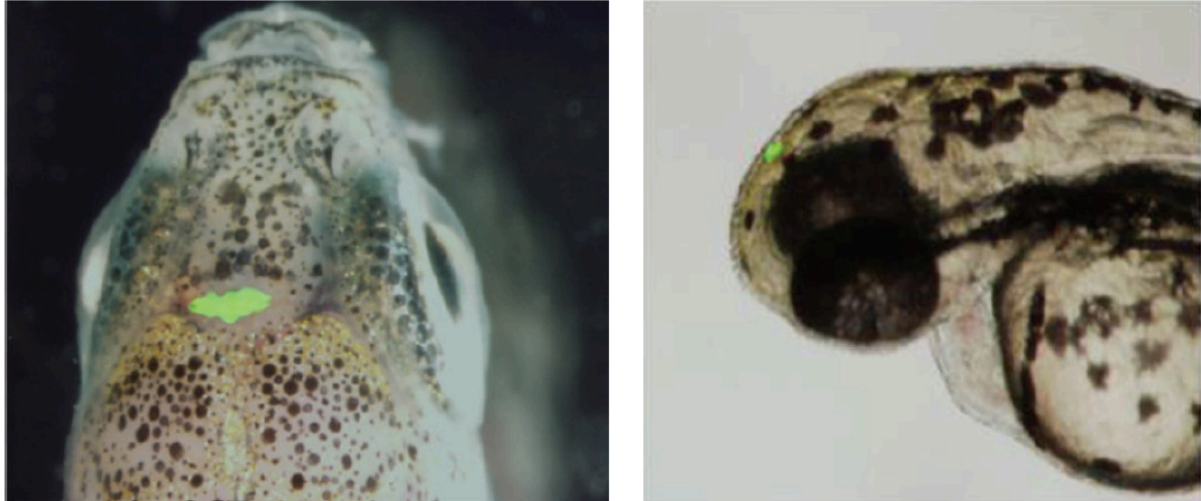
No *zebrafish*, a glândula pineal se desenvolve durante os estágios embrionários iniciais, e fica localizada na superfície dorsal do prosencéfalo, entre o telencéfalo e o teto óptico. Nessa espécie, o complexo pineal inclui o órgão pineal, o pedúnculo que emerge logo à esquerda da linha média, e um pequeno órgão chamado parapineal, que se encontra no lado esquerdo do cérebro (CONCHA et al., 2000; LIANG et al., 2000).

De acordo com Ben-Moshe et al. (2014), uma porção considerável do relógio molecular é regulada pela luz na glândula pineal, sugerindo que sua entrada é percebida e os estímulos são enviados para o relógio central por diversos mecanismos. Uma função fisiológica bastante conservada da glândula pineal é a produção de melatonina, indolamina liberada na circulação sanguínea que está envolvida na regulação dos ritmos biológicos de maneira rítmica (KLEIN, 2004).

Modelos transgênicos (FIGURA 7) forneceram evidências de que o relógio molecular nas células produtoras de melatonina da glândula pineal desempenham um papel fundamental, possivelmente como parte de um sistema de marca-passo múltiplo, modulando o comportamento nos ritmos circadianos (BEN-MOSHE LIVNE et al., 2016; BEN-MOSHE et al., 2014). Nesse sentido, o *zebrafish* traduz um modelo apropriado para obter uma

compreensão completa da relação entre a melatonina e o momento dos eventos fisiológicos (LIMA-CABELLO et al., 2014).

Figura 7 – A glândula pineal do *zebrafish*.



Legenda: glândula pineal em verde; (a) Região da cabeça de um *zebrafish* adulto, vista dorsal. (b) Região da cabeça de uma larva de *zebrafish* (72h após a fertilização), vista lateral.

Fonte: Adaptado de Ben-Moshe; Foulkes; Gothilf (2014).

2.4 O hormônio melatonina

A melatonina (N-acetil 5-metoxitriptamina) é uma molécula sintetizada a partir do aminoácido essencial L-Triptofano, altamente conservada em vertebrados, que desempenha um papel central no arrastamento de ritmos fisiológicos diários e anuais (LIMA-CABELLO et al., 2014). Sua liberação acontece de forma rítmica, atuando na sincronização das funções animais, agindo sobre uma complexa rede de regulação envolvendo mecanismos centrais e periféricos estreitamente coordenados, a fim de manter a integridade fisiológica (PEIRSON; HAIFORD; FOSTER, 2009; WHITMORE et al., 1998; WHITMORE; FOULKES; SASSONE-CORSI, 2000).

A liberação da melatonina ocorre de maneira semelhante em mamíferos e peixes, onde seu conteúdo plasmático é maior durante a fase escura e sua meia-vida tem duração aproximada de 35-50 minutos. Portanto, sua liberação reflete o fotoperíodo vigente, que sofre alterações de acordo com as estações, constituindo um importante indicador da duração de ambos. As variações diárias e anuais de sua produção rítmica permitem sincronizar o metabolismo, as funções fisiológicas e o comportamento às mudanças do ambiente (FALCÓN et al., 2007, 2010, 2011; MAITRA et al., 2013; REITER et al., 2009).

Embora a ritmicidade na produção de melatonina seja uma característica constante da fisiologia dos vertebrados, a organização anatômica dos sistemas difere-se marcadamente entre suas classes (SAHA et al., 2018). Muitos efeitos da melatonina são mediados por receptores específicos, amplamente distribuídos no organismo. Três tipos de receptores foram identificados em peixes, encontrados no cérebro, fígado, rins, intestino, gônadas e brânquias. Assim, os efeitos da melatonina dependem da disponibilidade de sítios de ligação ao longo do dia e do ano, bem como da sua liberação rítmica diária e anual proveniente da glândula pineal (FALCÓN et al., 2011).

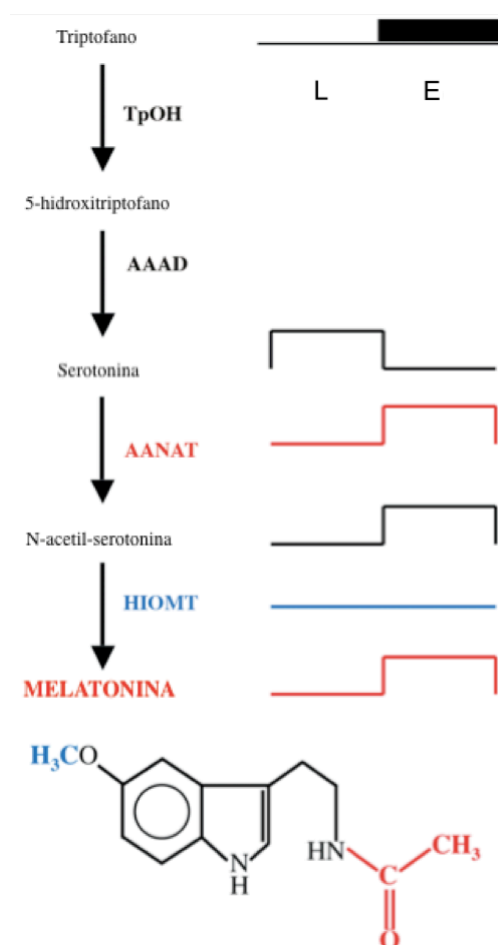
Vielma et al. (2014) afirmam que a melatonina é um hormônio endógeno com alto potencial na desintoxicação de radicais livres celulares. Além de seu papel na promoção da regulação do sono e dos ritmos circadianos, possui importantes efeitos imunomoduladores, antioxidantes, antiinflamatórios e neuroprotetores, sugerindo também que essa indolamina seja uma potencial alternativa terapêutica no combate à infecções bacterianas, virais e parasitárias.

2.4.1 Biossíntese e regulação da melatonina

A síntese da melatonina envolve muitas etapas enzimáticas (FIGURA 8). A via de biossíntese começa com a hidroxilação do triptofano, produzindo serotonina. A Aralquilamina-N-acetiltransferase (AANAT) catalisa a conversão de serotonina em N-acetilserotonina, que é emetilada pela ação da hidroxiindol-O-metiltransferase (HIOMT), para então, produzir melatonina (FALCÓN et al., 2007, 2010, 2011).

Em geral, a síntese de melatonina em peixes depende do relógio circadiano e da entrada de sinais externos (FIGURA 9A) (CAZAMÉA-CATALAN et al., 2014; FALCÓN et al., 2001). Durante a noite, o relógio circadiano impulsiona diretamente a transcrição de AANAT2, que é traduzida e fosforilada pela ativação da proteína quinase A (PKA). O pAANAT2 liga-se a proteínas protetoras da proteólise proteassomal, resultando na elevação de sua atividade e rápida síntese de melatonina. Com a luz, durante o dia, ocorre a diminuição da ativação da PKA, bem como os níveis de cálcio celular, e ambos os efeitos levam à diminuição da fosforilação do AANAT, com subsequente destruição pelo proteassoma. Isso diminui a produção de melatonina (FALCÓN et al., 2010; LI et al., 2016).

Figura 8 – Via de biossíntese da melatonina na pineal.



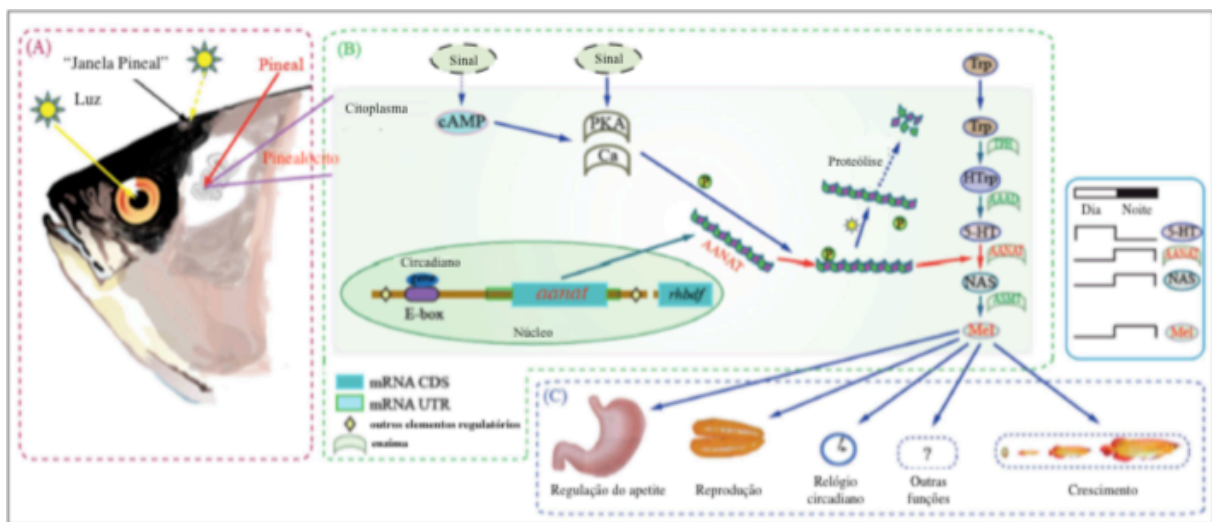
Legenda: Os ritmos diários dos compostos ou enzimas correspondentes estão indicados na coluna da direita. AAAD: aminoácido aromático descarboxilase; AANAT: arilalquilamina N-acetiltransferase; E: escuro (caixa preta); HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferase; L: luz; TpOH: triptofano hidroxilase.

Fonte: Falcón et al. (2007).

De forma mais detalhada, duas etapas transformam a serotonina em melatonina (FIGURA 9B): a enzima Arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT), chave do processo, catalisa a formação de N-acetilserotonina, e a acetilserotonina-O-metiltransferase (ASMT), também conhecida como hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), converte N-acetilserotonina em melatonina. Ao contrário de todos os outros vertebrados, os peixes teleósteos são os únicos que apresentam pelo menos duas formas de AANAT, conhecidas por AANAT1 (expressa mais especificamente na retina e no cérebro) e AANAT2 (expressa no órgão pineal) (FALCÓN et al., 2007, 2011; LIMA-CABELLO et al., 2014). Em algumas espécies de peixes, como baiacu (*Takifugu rubripes* e *Tetraodon nigroviridis*) e medaka (*Oryzias latipes*), foram encontrados três tipos de AANAT (COON; KLEIN, 2006).

A melatonina é transportada através do sistema circulatório e se liga aos seus receptores em diferentes órgãos (GANDHI et al., 2015), podendo influenciar na ingestão de alimentos e digestão, no crescimento e na atividade locomotora, além da reprodução (CARNEVALI et al., 2010; FALCÓN et al., 2010; LI et al., 2016; LÓPEZ-PATIÑO et al., 2011). Sabe-se que este hormônio desencadeia uma série de respostas no metabolismo dos peixes (FIGURA 9C), desempenhando um importante papel endócrino na regulação das atividades fisiológicas, bem como papéis parácrinos associam-se à melatonina secretada pela retina (GANDHI et al., 2015; LI et al., 2016).

Figura 9 – Esboço da biossíntese da melatonina.



Legenda: Anfíbios, répteis e peixes podem detectar a luz por células fotorreceptoras das retinas e pinealócitos das glândulas pineais. (A) O sistema de detecção e transformação fotoquímica inclui as células fotorreceptoras da retina e os pinealócitos; (B) A via de síntese da melatonina está resumida no quadro; (C) Melatonina executa suas várias funções biológicas em diferentes tecidos e em diferentes fases de crescimento/desenvolvimento através da ligação aos seus receptores. Nos mamíferos, o papel fotorreceptor da glândula pineal é perdido.

Fonte: Adaptado de Li et al. (2016).

No *zebrafish*, foram descritas as vias específicas de ação da melatonina, esclarecendo seus processos de secreção e regulação (ZHDANOVA, 2011). Nestes animais, existem dois tipos de AANAT, permitindo também sua expressão específica na pineal (APPELBAUM et al., 2004). De acordo com Lima-Cabello et al. (2014), os efeitos conhecidos da melatonina parecem ser mediados por receptores de alta afinidade, e suas flutuações diárias sugerem seu envolvimento na regulação circadiana de diversos eventos comportamentais e fisiológicos.

2.4.2 O órgão pineal, a retina e o cérebro

Os primeiros estudos sobre o órgão pineal em teleósteos enfatizaram seu papel na produção de melatonina e suas características fotorreceptoras, que logo pareceu estar envolvida no controle de funções e comportamentos que exibiam ritmos diários (EKSTRÖM; MEISSL, 1997; FALCÓN, 1999; FALCÓN et al., 2007, 2011). O órgão pineal é rodeado por vasos sanguíneos, e a vesícula pineal está localizada em uma região onde o crânio é geralmente mais fino e a pele é translúcida, traduzindo adaptações que favorecem a entrada de luz, e isso é observado até mesmo em peixes maiores como o atum-rabilho (*Thunnus thynnus*). O epitélio pineal contém células fotorreceptoras que se assemelham aos fotorreceptores retinianos, tanto do ponto de vista estrutural quanto funcional. Eles possuem o maquinário para a cascata de fototransdução (EKSTRÖM; MEISSL, 1997; FALCÓN, 1999; FALCÓN et al., 2007).

Uma particularidade do cone pineal é que a cinética da resposta à luz é mais lenta em comparação com o cone da retina (MEISSL; EKSTRÖM, 1988). Além do neurotransmissor excitatório, os fotorreceptores também produzem melatonina, pois os compostos (triptofano, serotonina e melatonina) e as enzimas e proteínas (AANAT, HIOMT, MAO) do metabolismo do indol localizam-se nessas células (FALCÓN et al., 2011).

As analogias morfofuncionais entre os fotorreceptores da glândula pineal e da retina levaram a crer que a biossíntese da melatonina retiniana ocorre nas células fotorreceptoras. De fato, tanto AANAT quanto HIOMT são expressos na camada nuclear externa (BESSEAU et al., 2006). No entanto, uma co-expressão de ambas as enzimas em pelo menos dois outros tipos de células também foi revelada: na camada nuclear interna basal e na camada de células ganglionares. Todos esses tipos de células expressam AANAT1 e não expressam AANAT2, sugerindo que a biossíntese da melatonina não é uma propriedade específica das células fotorreceptoras (FALCÓN et al., 2011).

A regulação da secreção de melatonina difere substancialmente na retina do peixe em comparação à glândula pineal de vertebrados. Enquanto um padrão noturno de secreção de melatonina é visto em algumas espécies, em outros o pico é diurno ou muda ao longo da estação. A melatonina retiniana não é liberada, mas age de maneira autócrina/parácrina. Curiosamente, AANAT1 também é expressa em algumas áreas distintas do cérebro, isoladamente ou em conjunto com o HIOMT. Isto inclui o telencéfalo, diencéfalo, lóbulos ópticos e cerebelo. A glândula hipófise também expressa AANAT (FALCÓN et al., 2010, 2011).

2.4.3 Efeitos da melatonina em peixes

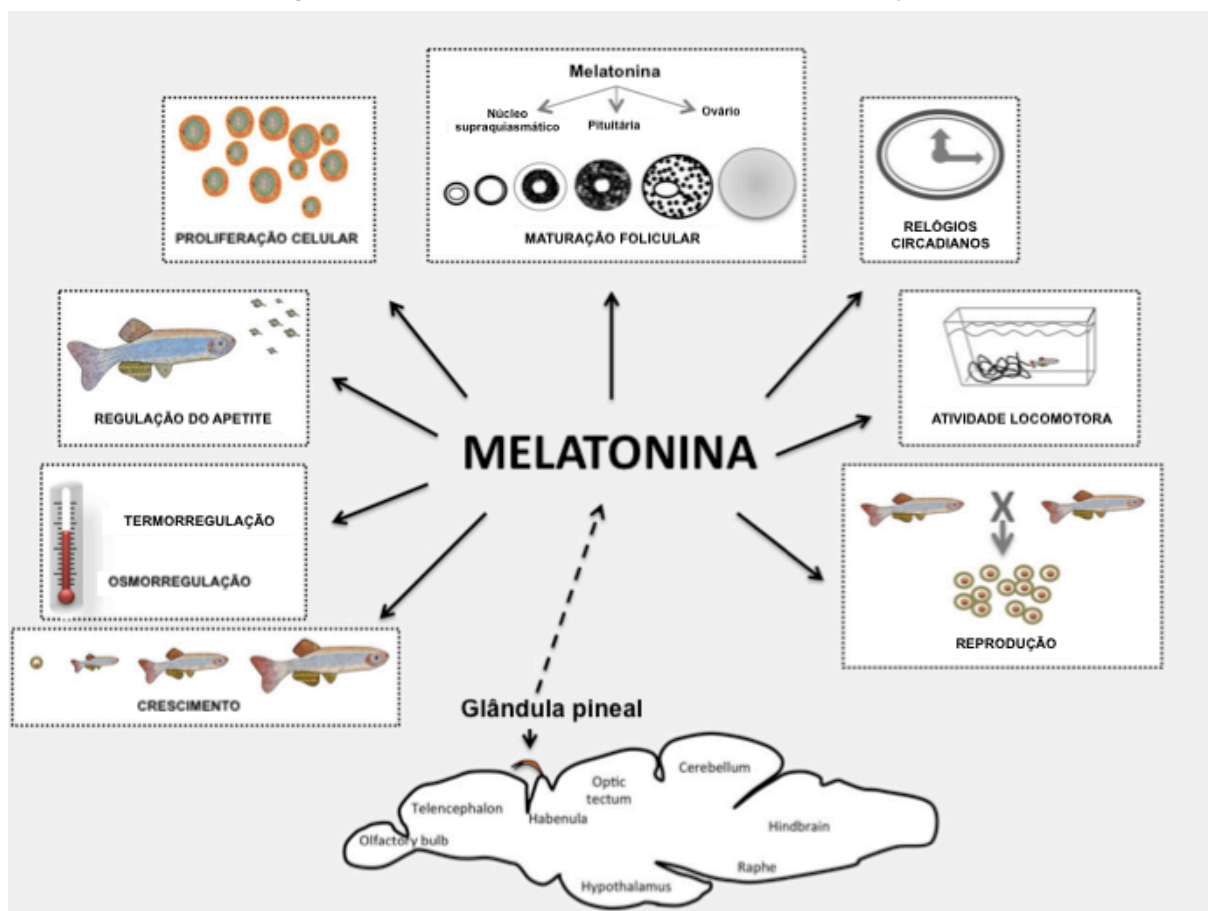
A melatonina contribui para a sincronização de comportamentos e regulações neuroendócrinas com as variações anuais do fotoperíodo. É um hormônio que desempenha um papel homeostático fundamental nas funções básicas dependentes de cronobiologia, incluindo sono, desenvolvimento, nutrição e reprodução, e também em funções neurais, como aprendizagem e memória (HOWE et al., 2013; LIMA-CABELLO et al., 2014). Existem evidências de como a melatonina atua no eixo cérebro-hipófise-gonadal, bem como sobre o controle da síntese de melatonina e a identificação de seus tecidos e receptores-alvo. No entanto, ainda não há informações suficientes sobre a presença e as funções dos metabólitos da melatonina em relação aos seus processos antioxidantes (GALANO; TAN; REITER, 2011, 2013; HARDELAND; TAN; REITER, 2009).

Direta e indiretamente, a melatonina funciona como um liberador de radicais livres. Suas outras atividades fisiológicas ou farmacológicas podem ser dependentes ou independentes de receptores localizados em diferentes células, órgãos e tecidos. Uma distribuição tão ampla de receptores para um único hormônio indica um tipo de harmonizador dentro de um conjunto de atividades rítmicas. Os múltiplos e complexos efeitos da melatonina na regulação neuroendócrina dos peixes ainda aguarda uma compreensão mais completa associada aos diferentes níveis do eixo neuroendócrino, bem como nas diferentes épocas do ano (FALCÓN et al., 2007, 2011). Além de seu papel na promoção da regulação do sono e dos ritmos circadianos, possui importantes efeitos imunomoduladores, antioxidantes e neuroprotetores, sugerindo que este indol deve ser considerado como uma alternativa terapêutica contra infecções (VIELMA et al., 2014).

A melatonina desempenha um papel importante como indicadora do tempo para o sistema circadiano endógeno. Nesse aspecto, o *zebrafish* tornou-se um excelente modelo para analisar a síntese, regulação e funções biológicas da melatonina extrapineal (FIGURA 10). Em peixes, como nos mamíferos, a melatonina também pode ser produzida em tecidos extrapineais que não na retina, e nestes tecidos os receptores também podem variar (ACUÑA-CASTROVIEJO et al., 2014; LIMA-CABELLO et al., 2014; VENEGAS et al., 2012). Além disso, Elbaz et al. (2013) classificaram o *zebrafish* como um modelo eficaz para o estudo de processos fisiológicos do sono devido a facilidade com as manipulações genéticas, possibilidade de acesso a imagens de circuitos nervosos e de acompanhamento comportamental.

Dias et al. (2017) afirmam que a fisiologia (desenvolvimento, sono, alimentação, memória, reprodução) e o comportamento (aprendizado, ansiedade) do *zebrafish* são afetados por esse neuro-hormônio. A melatonina exógena foi capaz de aumentar o nível de melatonina cerebral em *zebrafish*, sugerindo uma ação ao nível de sistema nervoso central (LOMBARDO et al., 2012). Portanto, como muitos tecidos distintos da glândula pineal possuem a capacidade de serem modulados pela melatonina, o *zebrafish* torna-se um interessante modelo para estudos utilizando a melatonina exógena.

Figura 10 - Funções associadas à melatonina no *zebrafish*.



Legenda: A glândula pineal (epífise) está localizada na superfície dorsal do diencéfalo, é alongada e composta de células endimárias, células semelhantes a melanócitos, astrócitos fibrócitos e pinealócitos, que representam a unidade morfofuncional da glândula. A melatonina exibe um ritmo circadiano; a maior parte da indolamina é produzida durante a fase escura do fotoperíodo. No *zebrafish*, os efeitos conhecidos da melatonina parecem ser mediados por receptores de alta afinidade. As flutuações diárias da melatonina sugerem seu envolvimento na regulação circadiana de diversos eventos comportamentais e fisiológicos do *zebrafish*.

Fonte: Adaptado de Lima-Cabello et al. (2014).

A melatonina favorece a redução do estresse oxidativo *in vitro* e *in vivo*, e isso está associado ao seu efeito antioxidante (DIAS et al., 2013; SHIN; LEE; CHOI, 2011). Para

avaliar um possível papel antiestresse da melatonina em peixes, Conde-Sieira et al. (2014) administraram melatonina oralmente à trutas arco-íris durante 10 dias, e nos últimos 4 dias os animais foram mantidos em alta densidade de estocagem. O tratamento com melatonina nos peixes que não foram estressados induziu um aumento no potencial glicogenolítico do fígado, aumentou a atividade de enzimas digestivas e o metabolismo serotoninérgico e dopaminérgico no hipotálamo. A presença de melatonina em peixes estressados reduziu significativamente as concentrações de cortisol no plasma, no teor de glicogênio e na atividade da glicogênio-sintase no fígado e no metabolismo dopaminérgico e serotoninérgico no hipotálamo. Em geral, a presença de melatonina atenuou vários dos efeitos induzidos pelo estresse (CONDE-SIEIRA et al., 2014).

Em relação à reprodução, em peixes, em sua maioria é sazonal ou periódica, e a desova ocorre em uma determinada estação no intuito de garantir a sobrevivência máxima da prole. A sequência de eventos reprodutivos em um ciclo anual está amplamente sob controle de um sistema de cronometragem endógeno específico de cada espécie. A duração da luz solar ou do fotoperíodo é um dos sinais ambientais mais previsíveis utilizados por um grande número de animais, incluindo peixes, para coordenar sua reprodução sazonal. Ao longo dos últimos anos, houve um enorme progresso na compreensão dos mecanismos pelos quais a melatonina regula a reprodução sazonal em peixes e em outros vertebrados, e a maioria dos estudos enfatiza as ações hormonais da melatonina através de seus receptores acoplados à proteína G no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HPG) dos peixes (MAITRA; HASAN, 2016).

Acreditava-se que a melatonina estaria envolvida apenas no mecanismo neuroendócrino como resposta ao fotoperíodo, inibindo a liberação de GnRH. Estudos evidenciaram que a melatonina atua também na regulação das funções associadas a gametas e esteroides gonadais, agindo no sistema hipotálamo-hipófise ou diretamente sobre as gônadas (MAITRA; HASAN, 2016). Além disso, pode atuar acelerando a ação do hormônio indutor da maturação ovocitária e, conseqüentemente, a retomada do ciclo celular meiótico (SOUTO et al., 2017).

A descoberta de que a melatonina, devido sua natureza lipofílica, pode facilmente atravessar a membrana plasmática de todas as células e atuar como um potente eliminador de radicais livres, estimulando diferentes antioxidantes, acrescentou uma nova dimensão ao entendimento dos mecanismos de ação da melatonina na regulação de funções ovarianas. O conceito básico sobre as ações da melatonina como antioxidante surgiu a partir de estudos com mamíferos. No entanto, alguns estudos sugeriram claramente que a melatonina, além de

desempenhar o papel de um hormônio, também pode estar associada à redução do estresse oxidativo, aumentando as funções ovarianas durante a desova (MAITRA et al., 2013; MAITRA; HASAN, 2016; MONIRUZZAMAN; HASAN; MAITRA, 2016).

Além disso, Montalbano et al. (2018) testaram os efeitos da administração de melatonina em *zebrafish* induzidos à obesidade, demonstrando que a suplementação com melatonina pode ter um efeito na mobilização das reservas de gordura, no aumento do metabolismo basal e, portanto, na prevenção do acúmulo de gordura em excesso.

2.5 Parâmetros bioquímicos e hematológicos associados ao estresse: metodologias para análise do nível de cortisol corporal, atividade enzimática e contagem de células sanguíneas em *zebrafish* adulto

Em peixes, o cortisol é um dos biomarcadores de estresse fisiológico mais utilizados. Embora sua produção seja renal, difunde-se facilmente através das membranas celulares, devido sua natureza lipofílica. Por isso, em peixes pequenos como o *zebrafish*, utiliza-se homogenatos de corpo inteiro para sua análise (CORTÉS et al., 2018; GESTO et al., 2015; RAMBO et al., 2017; ZHANG et al., 2015).

Existem na literatura diversas metodologias validadas na qual a análise baseia-se na técnica de maceração do corpo inteiro (homogenato) (CORTÉS et al., 2018; DHANASIRI; FERNANDES; KIRON, 2013; GESTO et al., 2015; RAMBO et al., 2017; SFAKIANAKIS; LERIS; KENTOURI, 2012; THOMAS et al., 2013; YEH; GLÖCK; RYU, 2013; ZHANG et al., 2015). Para tal, os animais devem ser mantidos em situação de congelamento em *freezer* (-80°C), e, posteriormente, submetidos ao processo de maceração de corpo inteiro, seguido por procedimentos de extração e análise.

Para a extração do cortisol, o protocolo sugere que as amostras sejam maceradas em nitrogênio líquido utilizando gral com pistilo de porcelana. Em seguida, devem ser diluídas em solução fosfato-salino (PBS), dissolvidas em éter dietílico, centrifugadas por 5 minutos a 3.500 rpm, secas em vapor de nitrogênio e mantidas resfriadas (CANAVELLO et al., 2011). Para o procedimento de leitura, as amostras devem ser ressuspensas em 1 mL de PBS e a montagem da placa deve seguir as instruções do fabricante. Normalmente, utiliza-se kits de imunoenensaio para leitura em placa, como o kit de ELISA, já testado e validado para utilização em peixes (VELASCO-SANTAMARÍA; CRUZ-CASALLAS, 2007).

Outros importantes biomarcadores associados ao estresse em animais são as enzimas antioxidantes, que atuam no intuito de prevenir os danos celulares causados pelas espécies

reativas de oxigênio (ROS), como o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH^-), o radical hidroperoxila (OOH^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O estresse oxidativo ocorre quando a produção de ROS ultrapassa a capacidade de neutralização ou eliminação dos sistemas de defesa antioxidante, resultando em diversos danos das membranas celulares e lipoproteínas através da peroxidação lipídica (ARDIANSYAH; INDRAYANI, 2007; SIES; JONES, 2007). O conteúdo de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é utilizado para medir a extensão da peroxidação lipídica, um dos principais contribuintes para a perda da função celular sob estresse oxidativo (BARTOSKOVA et al., 2014; STOREY, 1996).

Uma grande variedade de enzimas está envolvida na proteção contra a lipoperoxidação, e o aumento de sua atividade contribui para a eliminação de ROS, atuando através de processos de dismutação, decomposição e desintoxicação (BARTOSKOVA et al., 2013; ZHANG et al., 2004). De acordo com Wang et al. (2011), as enzimas superóxido distmutase (SOD) e Catalase (CAT) são as mais representativas na defesa antioxidante. A SOD, um tipo de enzima antioxidante que contém diferentes íons metálicos, atua na remoção do radical superóxido produzido no processo de oxidação biológica. A CAT tem como principal função a participação no processo de metabolismo ativo do oxigênio, catalisando a transformação de H_2O_2 em água e oxigênio.

Em peixes, o estresse oxidativo, bem como as defesas antioxidantes, possuem uma modulação complexa e podem ter um papel fundamental nos mecanismos de enfrentamento utilizados por esses animais durante os processos de adaptação à variabilidade ambiental (BIRNIE-GAUVIN et al., 2017). Diversos trabalhos analisaram o perfil de atividade enzimática no intuito de caracterizar uma situação de estresse, normalmente envolvendo a utilização de substâncias promotoras ou antioxidantes (AL-SAWAFI; YAN, 2013; ANSARI; ANSARI, 2015; BARTOSKOVA et al., 2013, 2014; CONDON; CHENOWETH; WILSON, 2010; MARCON et al., 2018a). Marcon et al. (2018) reforçaram a importância e sugeriram o *zebrafish* como um modelo animal adequado para investigar a neurobiologia do estresse.

Em *zebrafish*, a medida de estresse oxidativo é comumente realizada em amostras de corpo inteiro (sem a cabeça e a cauda), as quais são congeladas em nitrogênio líquido e, em seguida, maceradas e armazenadas em freezers ($-80^\circ C$). Para os ensaios, as amostras são pesadas e homogeneizadas (1:10 p / v) em tampão fosfato 50 mM gelado (pH = 7,2) e mantidas em gelo durante todos os procedimentos de determinação analítica para evitar a perda dos dados. Normalmente, os resultados obtidos devem ser corrigidos pelos valores de

proteína total do homogenato, e um dos métodos amplamente utilizados é o de Lowry (LOWRY et al., 1951).

Os ensaios de TBARS medem o malondialdeído (MDA) presente na amostra (BUEGE; AUST, 1978). O MDA, formado a partir da degradação de ácidos graxos poliinsaturados, serve como índice para determinação da extensão da reação de peroxidação. Assim, o MDA é identificado como o produto da peroxidação lipídica que reage com o ácido tiobarbitúrico, formando uma solução de cor avermelhada com absorvância a 535 nm.

A mensuração dos metabólitos reativos ao ácido tiobarbitúrico é realizada em microplacas de 96 poços pelo método descrito por Buege e Aust (1978). De acordo com o protocolo, o volume de 250 μ L do homogenato de cada amostra é colocado em tubos de ensaio, e adiciona-se 250 μ L de solução contendo ácido tricloroacético (TCA 15%), ácido tiobarbitúrico (TBA 0,0375%) e HCl 0,25N. As amostras são mantidas em banho maria fervente por 15 minutos e então colocadas sob água corrente até esfriarem. Em seguida, 750 μ L de álcool butílico são adicionados aos tubos, que são, então, vigorosamente agitados. Após uma centrifugação a 6000 rpm por 10 minutos em centrífuga de mesa, o sobrenadante é recolhido e plaqueado em duplicata, seguido pela leitura no espectrofotômetro. Uma curva padrão com o MDA é construída e os resultados expressos em nmol de MDA/mg de proteína.

O teor de radicais livres no corpo inteiro dos animais é mensurado utilizando-se o 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Resumidamente, 20 μ l de homogenato são pipetados por poço em duplicata em uma placa de 96 poços. Em seguida, 80 μ l de tampão fosfato 50 mM com pH 7,2 contendo DCFH-DA (concentração final de 10 μ M) são adicionados a cada poço, e a placa é incubada a 37 °C durante 30 minutos protegido da luz. A conversão de DCFH-DA em DCF (um composto fluorescente) acontece na presença de ROS e sua fluorescência pode ser detectada por fluorimetria com excitação/emissão a 485/530 nm. O conteúdo de ROS é quantificado utilizando uma curva padrão de DCF e os resultados são expressos como pmol de DCF formado/mg de proteína/minuto) (DRIVER; KODAVANTI; MUNDY, 2000).

A dosagem da atividade da superóxido dismutase (SOD) é baseada na sua habilidade em catalisar a dismutação de radicais superóxidos (O_2^-), à H_2O_2 e O_2 , diminuindo a razão de auto-oxidação do pirogalol. A técnica consiste em homogeneizar o tecido em tampão fosfato (50mM e pH 7,2). 30 μ L do homogenato são plaqueados em duplicata em uma placa com 96 poços, acrescido de 99 μ L de tampão fosfato, 6 μ L de MTT (brometo de dimetiliazol-difeniltetrazólio) e 15 μ L de pirogalol. Para o branco, o pirogalol é substituído por tampão fosfato, e para o padrão, a amostra é substituída por tampão fosfato. Após cinco minutos de

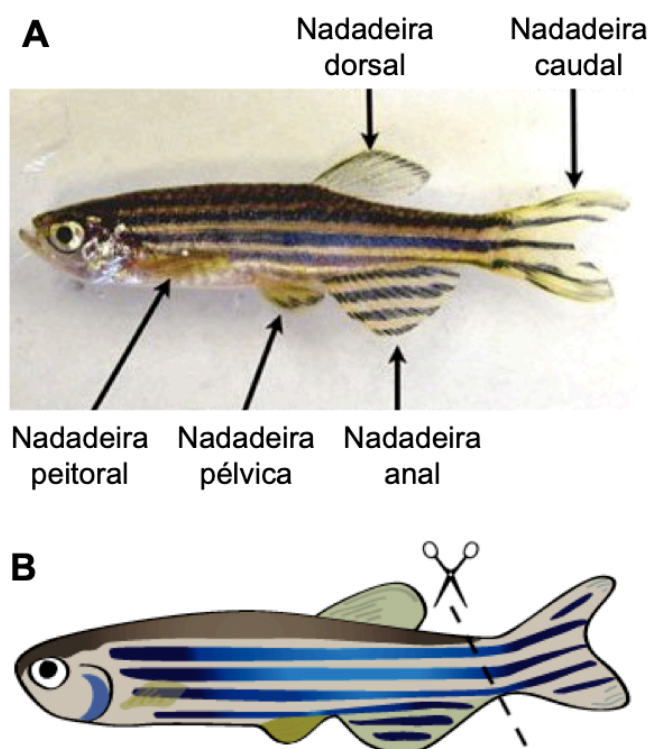
incubação a 37 °C, a reação é parada com 150 µL de DMSO (dimetil sulfóxido) e a absorbância lida a 570 nm. Para o cálculo do resultado considera-se que 1 unidade (U) de SOD é capaz de evitar a autooxidação de 50% de pirogallol do padrão. O resultado é expresso em Unidades por mg de proteína (U/mg proteínas) (DIETERICH et al., 2000).

A dosagem da atividade de CAT baseia-se no decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) – (A₂₄₀) pela decomposição deste pela catalase (2H₂O₂ → 2H₂O + O₂). Resumidamente, 25µL de homogenato são acrescentados a 1 mL de tampão fosfato 50 mM em uma cubeta de quartzo. São acrescentados 25 µL de solução de H₂O₂ 0,3M e lida a absorbância (A₂₄₀) durante um minuto. Os cálculos são feitos pela diferença de leitura no tempo final pelo tempo inicial, dividido pelo volume (mL) da amostra. O resultado é expresso em unidade de catalase por mg de proteína concentração de proteína (Atividade/mg de proteína) (AEBI, 1984).

Para obtenção do sangue, imediatamente após a eutanásia do animal, realizada através da submersão em água gelada (proporção de 5 partes de gelo / 1 parte de água, temperatura de 0-4°C) até a completa imobilização do animal (“Guidelines for Use of Zebrafish in the NIH Intramural Research Program”, 2016), deve ser realizada uma secção caudal com uma lâmina de bisturi entre a nadadeira caudal e a nadadeira anal (FIGURA 11) (PEDROSO et al., 2012).

Em seguida, o sangue que verte dessa incisão deve ser coletado por um tubo capilar heparinizado e utilizado para confecção de lâminas de extensão sanguínea, as quais devem ser fixadas com metanol por 1 minuto e coradas com panótico para contagem diferencial de células sanguíneas de defesa orgânica. Na contagem, utiliza-se 100 células em cada lâmina para estabelecimento do percentual de cada componente celular, sendo considerados trombócitos, linfócitos, eosinófilos, monócitos, neutrófilos, basófilos e leucócitos granulares (GRZELAK et al., 2017).

Figura 11 – Localização anatômica das nadadeiras do *zebrafish* (A) e representação esquemática da técnica de secção caudal (B).



Legenda: Nadadeiras dorsal, caudal, peitoral, pélvica e anal do *zebrafish* (setas) (A); Na técnica, utilizando uma lâmina de bisturi, imediatamente após a eutanásia do animal, realiza-se uma secção entre a nadadeira caudal e a nadadeira anal (B).

Fonte: Adaptado de Gupta; Mullins (2010) (A); Do autor (2018) (B).

2.6 O *zebrafish* como modelo para estudos comportamentais: parâmetros e protocolos em animais adultos

O *zebrafish* adulto vem emergindo como modelo comportamental para estudos toxicológicos, farmacológicos e de diversas doenças (SIEBEL; BONAN; SILVA, 2015). Uma das principais razões pelas quais os potenciais fármacos falham antes de chegarem ao mercado associa-se aos efeitos manifestados durante os ensaios clínicos. Antes dos testes em humanos, devem ser avaliadas as funções vitais, ou seja, o sistema circulatório, o sistema nervoso central, o trato gastrointestinal e o sistema esquelético. Apenas o *zebrafish* e o roedor possuem todos esses sistemas (WILLIAMS; HONG, 2011).

Apesar do sistema nervoso do *zebrafish* apresentar menor complexidade, em geral, a semelhança organizacional e fisiológica são evidentes. Ainda, apresenta sistemas bem desenvolvidos, como motor, endócrino e sensitivo, além de alta sensibilidade a alterações

ambientais e fenótipos comportamentais amplamente conhecidos (BURNE et al., 2011; EGAN et al., 2009; ROSEMBERG et al., 2011; SAGER; BAI; BURTON, 2010; SIEBEL; BONAN; SILVA, 2015; STEWART et al., 2013).

A consistência de diferenças individuais de comportamento animal e personalidade em reações a vários estresses ambientais entre seus estágios de vida pode refletir divergências básicas no estilo de enfrentamento, que podem afetar a sobrevivência, posição social e sucesso reprodutivo na natureza (YUAN et al., 2018). Nesse sentido, o *zebrafish* adulto vem sendo um dos modelos mais utilizados no estudo da genética comportamental (DA SILVA CHAVES et al., 2018; KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014; STEWART et al., 2015), englobando comportamento social (SHAMS et al., 2017), medo (CHOI et al., 2018), aprendizado e memória (LEIGHTON et al., 2018), ansiedade e estresse (PANCOTTO et al., 2018), entre outros.

Nessa perspectiva, inúmeros protocolos utilizando o *zebrafish* como modelo vem sendo aprimorados e otimizados nos quesitos material e técnico, como a esquiiva inibitória (GESTO et al., 2015) e o labirinto em Y (BORTOLOTTI et al., 2014). A agressividade pode ser avaliada através da quantificação de movimentos de combate do animal frente a um espelho (MICHELOTTI et al., 2018). Protocolos de *shoaling* avaliam a sociabilidade do animal e suas manifestações de medo podem ser observadas durante a exposição a um predador (FONTANA et al., 2018).

Siebel, Bonan e Silva (2015) descrevem os principais testes utilizados em *zebrafish* adultos. Para o teste de exposição ao predador, utiliza-se a exposição visual a um predador conhecido, induzindo respostas características de medo. No protocolo do teste de *shoaling*, as avaliações podem ser feitas manualmente (registro de imagens) ou pelo uso de *softwares*. Para a agressividade, utiliza-se um pequeno aquário e um espelho colocado em sua lateral com inclinação de 22,5°. Depois de 30 segundos de habituação, os animais tem seu comportamento registrado por 60 segundos, e novamente após 10 minutos de habituação. Na avaliação, o aquário é dividido em quadrantes esquerdo e direito superiores e inferiores.

O aparato para o teste de interação social consiste em um aquário vazio e um aquário estímulo contendo um grupo de peixes, e é importante utilizar aquários com medidas padronizadas (10 cm de largura e 15 cm de altura) para que não ocorra influência do tamanho. O comportamento é registrado em vídeo durante 10 segundos após os 30 segundos de aclimação. Na análise do vídeo, o aquário central é dividido ao meio.

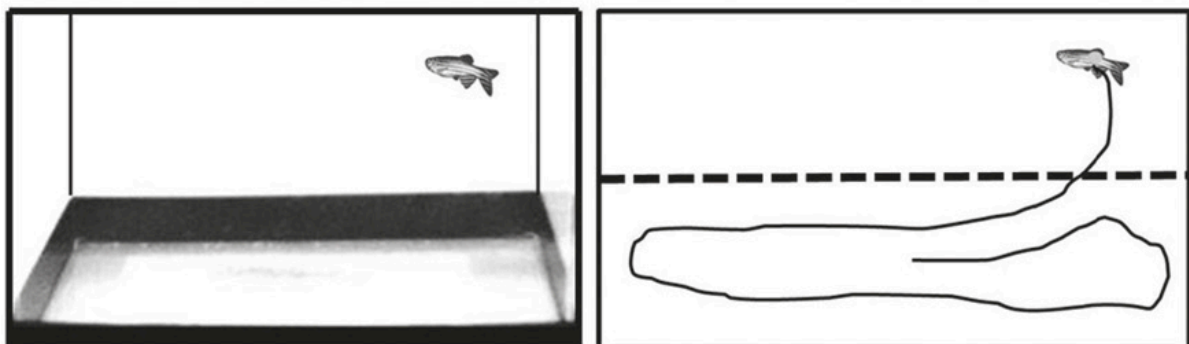
Para o labirinto em Y, utiliza-se um aquário de vidro com três braços de tamanhos iguais (25 cm de comprimento, 8 cm de largura e 15 cm de altura), com paredes pretas e

fundo branco. Dispostas em cada braço, ficam as pistas visuais, que consistem em figuras geométricas brancas (círculo, triângulo e quadrado). O animal é colocado durante 5 minutos na sessão teste com dois braços abertos, e, após um intervalo de 1-6 horas, o animal é submetido ao teste.

No teste de esquiua inibitória, o nível da água é mantido a 3 cm, permitindo a exploração do ambiente. O animal é colocado no lado claro com a barreira fechada, e após 1 minuto de familiarização, a divisória é elevada 1 cm. No compartimento escuro, existem dois eletrodos (8V), que emitem choques durante 5 segundos quando ocorre a ultrapassagem de toda a divisória. 24 horas depois, o animal é colocado novamente em teste, porém, sem os choques. O *Sppining Task* consiste na manutenção do *zebrafish* em um aparato circular contendo água em movimento (aquário redondo de 1 litro disposto sobre um agitador magnético). A atividade natatória é registrada durante 3 minutos.

O teste de campo aberto (FIGURA 12) consiste em colocar o animal em um aquário e registrar seu comportamento durante um intervalo de tempo para análise posterior. Normalmente, o vídeo é analisado através de *softwares* que contém as mais diversas ferramentas. Entre os mais utilizados estão o *Any-Maze* (ROSEMBERG et al., 2011), o *Viewpoint* (LANGE et al., 2013), o *TopScan* (CACHAT et al., 2011), o *Argus* (SHAMS et al., 2018) e o *EthoVision* (BROCK et al., 2017; FARIA et al., 2018; STEWART et al., 2015).

Figura 12 – Teste de campo aberto para *zebrafish* adulto.



Legenda: O *zebrafish* é colocado em um aquário simples, de cor uniforme, sem divisória ou estímulos e tem seu comportamento registrado em vídeo. Durante a análise, o aquário é dividido ao meio em duas áreas, topo e fundo, para a análise da posição do animal na coluna de água.

Fonte: Adaptado de Siebel; Bonan; Silva (2015).

O quadro 2 resume os principais testes utilizados para avaliar diversas respostas associadas ao comportamento em *zebrafish* adulto. Dentre as principais aplicações e possibilidades terapêuticas, estão a triagem de medicamentos, principalmente na fase pré-

clínica; triagens genéticas, identificando o papel dos genes em patologias; abordagem fenotípica para o descobrimento de drogas e análises toxicológicas associadas a um potencial terapêutico, principalmente para algumas doenças como a doença de Parkinson, epilepsia e doença de Alzheimer (AFRIKANOVA et al., 2013; LEIGHTON et al., 2018; SARATH BABU et al., 2016; VAZ; OUTEIRO; FERREIRA, 2018).

Quadro 2 – Protocolos comportamentais em *zebrafish* adulto (Continua).

Teste	Variável	Comportamento	Respostas associadas	Aplicação
Exposição ao predador	Medo	Distância em relação ao predador, posição no aquário (fundo ou superfície) e atividade natatória	Afastamento do predador, permanência no fundo do aquário, <i>freezing</i> e movimentos erráticos	Distúrbios de ansiedade e fobias
<i>Shoaling</i>	Interação social	Distância entre os animais, sincronismo de nado e afastamento dos outros animais	Coesão do cardume e isolamento	Autismo, esquizofrenia, doenças comportamentais, estresse
Agressividade	Agressividade	Tempo em que o animal permanece em cada região do aquário (aproximação ou distanciamento), tempo com nadadeiras eretas	Aproximação à imagem refletida, movimentação ondulatória e pequenas batidas com a nadadeira caudal, tentativas de "morder" o espelho	Alcoolismo
Interação social	Preferência social	Tempo de permanência nos quadrantes	Maior permanência no quadrante ao lado do aquário estímulo indica maior interação social	Esquizofrenia
Labirinto em Y	Memória	Comportamento exploratório	Mais tempo no compartimento novo do aparato demonstra aquisição e consolidação de memória	Farmacologia (triagem de medicamentos)
Esquiva inibitória	Memória	Distinção claro/escuro (preferência), tempo no lado preferido	Latência para passagem para o lado escuro é o índice de retenção de memória	Doenças neuronais

Quadro 2 – Protocolos comportamentais em *zebrafish* adulto (Conclusão).

<i>Spinning task</i>	Coordenação motora e resistência	Nado contra a corrente	Declínio no tempo de nado contra a corrente demonstram menor coordenação e resistência	Farmacologia (medicamentos com efeito na coordenação motora)
Campo aberto	Atividade locomotora	Distância percorrida, velocidade média, permanência no fundo ou no topo do aquário, atividade natatória, <i>freezing</i>	Movimentos erráticos, preferência pela profundidade do aquário, atividade exploratória diminuída são indicadores de ansiedade ou estresse	Ansiedade e estresse (fármacos)

Fonte: Adaptado de Siebel; Bonan; Silva (2015).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a ampla utilização do *zebrafish* em estudos da área biomédica, principalmente envolvendo doenças que acometem a população em grande escala, faz-se cada vez mais necessária sua validação como modelo experimental.

Dentro de toda a temática abordada, ao longo dos anos, diversas pesquisas em peixes forneceram importantes percepções sobre a fisiologia ligada ao estresse, ampliando consideravelmente os paradigmas que descrevem a forma como esses animais respondem aos estressores. No entanto, ainda existem inúmeras incógnitas que devem ser desvendadas para que se possa ter uma compreensão abrangente do estresse em peixes, sobretudo em situações agudas e crônicas. Além disso, ainda é necessária também a busca por mais informações sobre a regulação da melatonina e sua influência diante das respostas fisiológicas em peixes.

Portanto, este trabalho fornece uma base científica para o estudo comportamental e bioquímico no que diz respeito aos efeitos da melatonina em *zebrafish* submetidos ao estresse, fornecendo novas perspectivas que podem ser úteis para pesquisas futuras.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. S. DE et al. Zebrafish models: do we have valid paradigms for depression? **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, 2018.
- ACUÑA-CASTROVIEJO, D. et al. Extrapeineal melatonin: Sources, regulation, and potential functions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 16, p. 2997–3025, 2014.
- ADAMSON, K. I.; SHERIDAN, E.; GRIERSON, A. J. Use of zebrafish models to investigate rare human disease. **Journal of Medical Genetics**, v. 0, p. 1–9, 2018.
- AFRIKANOVA, T. et al. Validation of the Zebrafish Pentylenetetrazol Seizure Model: Locomotor versus Electrographic Responses to Antiepileptic Drugs. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e54166, 14 jan. 2013.
- AL-SAWAFI, A. G. A.; YAN, Y. Bioconcentration and Antioxidant Status Responses in Zebrafish (*Danio Rerio*) Under Atrazine Exposure. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 4, n. 4, p. 204–208, 2013.
- ALURU, N.; VIJAYAN, M. M. Stress transcriptomics in fish: A role for genomic cortisol signaling. **General and Comparative Endocrinology**, v. 164, n. 2–3, p. 142–150, nov. 2009.
- ANSARI, S.; ANSARI, A. B. Biochemical markers of oxidative stress in zebrafish *Danio rerio* exposed to cadmium chloride. **Annals of Biological Research**, v. 6, n. 8, p. 6–12, 2015.
- APPELBAUM, L. et al. Zebrafish Serotonin-N-Acetyltransferase-2 Gene Regulation: Pineal-Restrictive Downstream Module Contains a Functional E-Box and Three Photoreceptor Conserved Elements. **Molecular Endocrinology**, v. 18, n. 5, p. 1210–21, 2004.
- ARDIANSYAH; INDRAYANI. Natural Antioxidants Dietary and Lipid Oxidation Analysis in Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Tissue. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 14, n. 3, p. 87–92, 2007.
- ARÉVALO, J. C. et al. Generation and characterization of antibodies against opioid receptors from zebrafish. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, 2018.
- ARUNACHALAM, M. et al. Natural History of Zebrafish (*Danio rerio*) in India. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2013.
- BARTON, B. A. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 3, p. 517–525, 2002.
- BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 1, p. 3–26, jan. 1991.
- BARTOSKOVA, M. et al. Evaluation of ibuprofen toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of oxidative stress. **Neuroendocrinology Letters**, v. 34, p.

102–108, 2013.

BARTOSKOVA, M. et al. Norfloxacin - Toxicity for Zebrafish (*Danio rerio*) focused on oxidative stress parameters. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 215, 2014.

BECKER, C. G.; BECKER, T. Adult zebrafish as a model for successful central nervous system regeneration. **Restorative neurology and neuroscience**, v. 26, p. 71–80, 2008.

BEN-MOSHE LIVNE, Z. et al. Genetically Blocking the Zebrafish Pineal Clock Affects Circadian Behavior. **PLoS Genetics**, v. 12, n. 11, p. 1–26, 2016.

BEN-MOSHE, Z. et al. The light-induced transcriptome of the zebrafish pineal gland reveals complex regulation of the circadian clockwork by light. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 6, p. 3750–3767, 2014.

BEN-MOSHE, Z.; FOULKES, N. S.; GOTHILF, Y. Functional development of the circadian clock in the zebrafish pineal gland. **BioMed Research International**, 2014.

BENCAN, Z.; SLEDGE, D.; LEVIN, E. D. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 94, n. 1, p. 75–80, 2009.

BESSEAU, L. et al. Melatonin pathway: breaking the ‘high-at-night’ rule in trout retina. **Experimental Eye Research**, v. 82, n. 4, p. 620–627, abr. 2006.

BIRNIE-GAUVIN, K. et al. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. **Fish and Fisheries**, v. 18, n. 5, p. 928–942, 2017.

BOONSTRA, R. Reality as the leading cause of stress: rethinking the impact of chronic stress in nature. **Functional Ecology**, v. 27, n. 1, p. 11–23, 1 fev. 2013.

BORTOLOTTI, J. W. et al. Long-Term Exposure to Paraquat Alters Behavioral Parameters and Dopamine Levels in Adult Zebrafish (*Danio Rerio*). **Zebrafish**, v. 11, n. 2, p. 142–153, abr. 2014.

BOSWELL, C. W.; CIRUNA, B. Understanding Idiopathic Scoliosis: A New Zebrafish School of Thought. **Trends in Genetics**, v. 33, n. 3, p. 183–196, 2017.

BROCK, A. J. et al. Assessing the Value of the Zebrafish Conditioned Place Preference Model for Predicting Human Abuse Potential. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 363, n. 1, p. 66–79, out. 2017.

BURNE, T. et al. Big ideas for small brains: what can psychiatry learn from worms, flies, bees and fish? **Molecular Psychiatry**, v. 16, n. 1, p. 7–16, 30 jan. 2011.

CACHAT, J. M. et al. Video-Aided Analysis of Zebrafish Locomotion and Anxiety-Related Behavioral Responses. In: [s.l.: s.n.]. p. 1–14.

CANAVELLO, P. R. et al. Neuromethods: Preface. **Neuromethods**, v. 51, n. 2, p. 135–142, 2011.

CARNEVALI, O. et al. Melatonin control of oogenesis and metabolic resources in Zebrafish. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 26, n. 5, p. 826–830, 2010.

CAZAMÉA-CATALAN, D. et al. The timing of timezyme diversification in vertebrates. **PLoS ONE**, 2014.

CHENG, C. H. et al. Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (Takifugu obscurus). **Aquatic Toxicology**, v. 164, p. 61–71, 2015.

CHOI, J.-H. et al. Targeted knockout of a chemokine-like gene increases anxiety and fear responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 5, p. E1041–E1050, 2018.

CONCHA, M. L. et al. A nodal signaling pathway regulates the laterality of neuroanatomical asymmetries in the zebrafish forebrain. **Neuron**, v. 28, n. 2, p. 399–409, nov. 2000.

CONDE-SIEIRA, M. et al. Oral administration of melatonin counteracts several of the effects of chronic stress in rainbow trout. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 46, n. 1, p. 26–36, 2014.

CONDON, C. H.; CHENOWETH, S. F.; WILSON, R. S. Zebrafish take their cue from temperature but not photoperiod for the seasonal plasticity of thermal performance. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 21, p. 3705–3709, 2010.

COON, S. L.; KLEIN, D. C. Evolution of arylalkylamine N-acetyltransferase: Emergence and divergence. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 252, n. 1–2, p. 2–10, 27 jun. 2006.

CORTÉS, R. et al. Effects of acute handling stress on short-term central expression of orexigenic / anorexigenic genes in zebrafish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 257–272, 2018.

DA SILVA CHAVES, S. N. et al. Behavioral and biochemical effects of ethanol withdrawal in zebrafish. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 169, n. April, p. 48–58, 2018.

DAMETTO, F. S. et al. Feeding regimen modulates zebrafish behavior. **PeerJ**, v. 6, p. 1–17, 2018.

DEMIN, K. A. et al. Zebrafish models relevant to studying central opioid and endocannabinoid systems. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 86, n. March, p. 301–312, 2018.

DHABHAR, F. S. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 5, p. 300–17, 2008.

DHANASIRI, A. K. S.; FERNANDES, J. M. O.; KIRON, V. Acclimation of zebrafish to transport stress. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 87–98, 2013.

DIAS, C. A. G. D. M. et al. Luz, Melatonina E Estresse Oxidativo Na Piscicultura. **Biota Amazônia**, v. 3, n. 3, p. 169–176, 2013.

DIAS, C. A. G. DE M. et al. Melatonina e Peixes : Uma Revisão. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, 2017.

DRIVER, A. S.; KODAVANTI, P. R. S.; MUNDY, W. R. Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. **Neurotoxicology and Teratology**, 2000.

EGAN, R. J. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 205, n. 1, p. 38–44, 2009.

EKSTRÖM, P.; MEISSL, H. The pineal organ of teleost fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 7, n. 2, p. 199–284, 1997.

ESTEBAN, M. Á. et al. Influence of melatonin on the immune system of fish: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 7979–7999, 2013.

FALCÓN, J. Cellular circadian clocks in the pineal. **Progress in neurobiology**, v. 58, n. 2, p. 121–62, jun. 1999.

FALCÓN, J. et al. Regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase-2 (AANAT2, EC 2.3.1.87) in the fish pineal organ: Evidence for a role of proteasomal proteolysis. **Endocrinology**, 2001.

FALCÓN, J. et al. Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 18, n. 2, p. 81–88, 2007.

FALCÓN, J. et al. Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 469–482, 2010.

FALCÓN, J. et al. Melatonin, the time keeper: biosynthesis and effects in fish. **Cybiurn**, v. 35, n. 1, p. 3–18, 2011.

FARIA, M. et al. Acrylamide acute neurotoxicity in adult zebrafish. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 7918, 21 maio 2018.

FENG, N. Y.; BASS, A. H. Melatonin action in a midbrain vocal-acoustic network. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 7, p. 1046–1057, 2014.

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

GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 1, p. 1–16, ago. 2011.

GALANO, A.; TAN, D. X.; REITER, R. J. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 3, p. 245–257, abr. 2013.

- GANDHI, A. V. et al. Melatonin Is required for the circadian regulation of sleep. **Neuron**, v. 85, n. 6, p. 1193–9, 2015.
- GESTO, M. et al. Is gill cortisol concentration a good acute stress indicator in fish? A study in rainbow trout and zebrafish. **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology**, v. 188, p. 65–69, 2015.
- GHENO, E. M. et al. Zebrafish in Brazilian Science: Scientific Production, Impact, and Collaboration. **Zebrafish**, v. 13, n. 3, p. 217–225, 2016.
- GORE, A. V. et al. The zebrafish: A fantastic model for hematopoietic development and disease. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 7, n. 3, p. 1–17, 2018.
- GORISSEN, M.; FLIK, G. **The Endocrinology of the Stress Response in Fish: An Adaptation-Physiological View**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. v. 35
- GRZELAK, A. K. et al. Stress leukogram induced by acute and chronic stress in zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Medicine**, v. 67, n. 3, p. 263–269, 2017.
Guidelines for Use of Zebrafish in the NIH Intramural Research Program. p. 1–3, 2016.
- HAN, Y. et al. Genotoxicity and oxidative stress induced by the fungicide azoxystrobin in zebrafish (*Danio rerio*) livers. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 133, p. 13–19, 2016.
- HARDELAND, R.; TAN, D.-X.; REITER, R. J. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. **Journal of Pineal Research**, v. 47, n. 2, p. 109–126, set. 2009.
- HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013.
- IDDA, M. L. et al. Circadian clocks: Lessons from fish. **Progress in Brain Research**, v. 199, p. 41–57, 2012.
- JOBLING, M. **Fish bioenergetics**. [s.l.] Chapman & Hall, 1994.
- KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 2, p. 63–75, 2014.
- KHAN, K. M. et al. Zebrafish models in neuropsychopharmacology and CNS drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 13, p. 1925–1944, 2017.
- KLEIN, D. C. The 2004 Aschoff/Pittendrigh Lecture: Theory of the Origin of the Pineal Gland— A Tale of Conflict and Resolution. **Journal of Biological Rhythms**, v. 19, n. 4, p. 264–279, 29 ago. 2004.
- KOOLHAAS, J. M. et al. Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 5, p. 1291–1301, abr. 2011.

- KORTE, S. M.; OLIVIER, B.; KOOLHAAS, J. M. A new animal welfare concept based on allostasis. **Physiology & Behavior**, v. 92, n. 3, p. 422–428, 22 out. 2007.
- LANGE, M. et al. Inter-individual and inter-strain variations in zebrafish locomotor ontogeny. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e70172, 2013.
- LEIGHTON, P. L. A. et al. An ancient conserved role for prion protein in learning and memory. **Biology open**, v. 7, n. 1, 22 jan. 2018.
- LI, J. et al. Molecular evolution of aralkylamine n-acetyltransferase in fish: A genomic survey. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 1, p. 1–15, 2016.
- LIANG, J. O. et al. Asymmetric nodal signaling in the zebrafish diencephalon positions the pineal organ. **Development (Cambridge, England)**, v. 127, n. 23, p. 5101–12, dez. 2000.
- LIMA-CABELLO, E. et al. A review of the melatonin functions in zebrafish physiology. **Journal of Pineal Research**, v. 57, n. 1, p. 1–9, 2014.
- LIMA, L. C. et al. Stress in fishes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, n. 3/4, p. 113–117, 2006.
- LOMBARDO, F. et al. Melatonin effects on *Fundulus heteroclitus* reproduction. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 6, p. 794–803, 2012.
- LÓPEZ-PATIÑO, M. A. et al. Changes in plasma melatonin levels and pineal organ melatonin synthesis following acclimation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to different water salinities. **The Journal of experimental biology**, v. 214, n. Pt 6, p. 928–36, 2011.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, 1951.
- LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13–30, 2011.
- MAITRA, S. K. et al. Melatonin: A potent candidate in the regulation of fish oocyte growth and maturation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 181, n. 1, p. 215–222, 2013.
- MAITRA, S. K.; HASAN, K. N. The Role of melatonin as a hormone and an antioxidant in the control of fish reproduction. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, p. 1–11, 2016.
- MANUEL, R. et al. Unpredictable chronic stress decreases inhibitory avoidance learning in Tuebingen long-fin zebrafish: stronger effects in the resting phase than in the active phase. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, n. 21, p. 3919–3928, 2014.
- MARCON, M. et al. Enriched environment prevents oxidative stress in zebrafish submitted to unpredictable chronic stress. **PeerJ**, v. 6, n. 2004, p. 1–15, 2018a.
- MARCON, M. et al. Environmental enrichment modulates the response to chronic stress in zebrafish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 4, p. jeb176735, 2018b.

MATHUR, P.; GUO, S. Use of zebrafish as a model to understand mechanisms of addiction and complex neurobehavioral phenotypes. **Neurobiology of Disease**, v. 40, n. 1, p. 66–72, 2010.

MCEWEN, B. S.; WINGFIELD, J. C. The concept of allostasis in biology and biomedicine. **Hormones and Behavior**, v. 43, n. 1, p. 2–15, 2003.

MEISSL, H.; EKSTRÖM, P. Photoreceptor responses to light in the isolated pineal organ of the trout, *Salmo gairdneri*. **Neuroscience**, v. 25, n. 3, p. 1071–6, jun. 1988.

MICHELOTTI, P. et al. Ketamine modulates aggressive behavior in adult zebrafish. **Neuroscience Letters**, v. 684, p. 164–168, 10 set. 2018.

MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, n. 3, p. 211–268, 1999.

MONIRUZZAMAN, M.; HASAN, K. N.; MAITRA, S. K. Melatonin actions on ovaprim (synthetic GnRH and domperidone)-induced oocyte maturation in carp. **Reproduction**, v. 151, n. 4, p. 285–296, 2016.

MONTALBANO, G. et al. Melatonin treatment suppresses appetite genes and improves adipose tissue plasticity in diet-induced obese zebrafish. **Endocrine**, p. 1–13, 2018.

MORGAN, E. Ecological significance of biological clocks. **Biological Rhythm Research**, v. 35, n. 1–2, p. 3–12, 2004.

NARDOCCI, G. et al. Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 40, n. 2, p. 531–538, 2014.

NOWIK, N. et al. Zebrafish: An animal model for research in veterinary medicine. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 18, n. 3, p. 663–674, 2015.

OBA, E. T.; MARIANO, W. DOS S.; SANTOS, L. R. B. DOS. Estresse em peixes cultivados: Agravantes e atenuantes para manejo. In: **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: [s.n.]. p. 226–247.

ØVERLI, Ø. et al. Evolutionary background for stress-coping styles: Relationships between physiological, behavioral, and cognitive traits in non-mammalian vertebrates. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 3, p. 396–412, jan. 2007.

ØVERLI, Ø.; KOTZIAN, S.; WINBERG, S. Effects of cortisol on aggression and locomotor activity in rainbow trout. **Hormones and behavior**, v. 42, n. 1, p. 53–61, 2002.

PACÁK, K. et al. Stressor-Specific Activation of Catecholaminergic Systems: Implications for Stress-Related Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Responses. **Advances in Pharmacology**, v. 42, p. 561–564, 1 jan. 1998.

PANCOTTO, L. et al. Anxiolytic and anti-stress effects of acute administration of acetyl-L-carnitine in zebrafish. **PeerJ**, v. 6, p. 1–18, 2018.

PARICHY, D. M. Homology and the evolution of novelty during Danio adult pigment pattern development. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, v. 308B, n. 5, p. 578–590, 15 set. 2007.

PAVLIDIS, M.; THEODORIDI, A.; TSALAFOUTA, A. Neuroendocrine regulation of the stress response in adult zebrafish, *Danio rerio*. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 60, p. 121–131, 2015.

PEDROSO, G. L. et al. Blood Collection for Biochemical Analysis in Adult Zebrafish. **Journal of Visualized Experiments**, v. 63, p. 1–3, 2012.

PEIRSON, S. N.; HAIFORD, S.; FOSTER, R. G. The evolution of irradiance detection: Melanopsin and the non-visual opsins. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1531, p. 2849–2865, 2009.

PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G. Biochemical effects of stress. In: [s.l: s.n.]. p. 349–379.

RAMBO, C. L. et al. Gender differences in aggression and cortisol levels in zebrafish subjected to unpredictable chronic stress. **Physiology and Behavior**, v. 171, p. 50–54, 2017.

REITER, R. J. et al. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered gene for melatonin. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 44, n. 4, p. 175–200, 2009.

ROSEMBERG, D. B. et al. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. **PLoS one**, v. 6, n. 5, p. 1–11, 2 maio 2011.

SAGER, J. J.; BAI, Q.; BURTON, E. A. Transgenic zebrafish models of neurodegenerative diseases. **Brain Structure and Function**, v. 214, n. 2–3, p. 285–302, 17 mar. 2010.

SAHA, S. et al. Melatonin synthesis and clock gene regulation in the pineal organ of teleost fish compared to mammals: Similarities and differences. **General and Comparative Endocrinology**, 2018.

SARATH BABU, N. et al. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induced Parkinson's disease in zebrafish. **PROTEOMICS**, v. 16, n. 9, p. 1407–1420, maio 2016.

SCHRECK, C. B. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 549–556, 2010.

SCHRECK, C. B.; TORT, L. The Concept of Stress in Fish. In: **Fish Physiology**. First Edit ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2016. v. 35p. 1–34.

SELYE, H. Stress and the general adaptation syndrome. **British medical journal**, v. 1, n. 4667, p. 1383–92, 17 jun. 1950.

SELYE, H. Homeostasis and heterostasis. **Perspectives in biology and medicine**, v. 16, n. 3, p. 441–5, 1973.

SFAKIANAKIS, D. G.; LERIS, I.; KENTOURI, M. Exercise-related muscle lactate metabolism in zebrafish juveniles : The effect of early life temperature. **Italian Journal of Zoology**, v. 79, n. 4, p. 568–573, 2012.

SHAMS, S. et al. Effect of social isolation on anxiety-related behaviors, cortisol, and monoamines in adult zebrafish. **Behavioral Neuroscience**, v. 131, n. 6, p. 492–504, 2017.

SHAMS, S. et al. Argus: An open-source and flexible software application for automated quantification of behavior during social interaction in adult zebrafish. **Behavior Research Methods**, 2018.

SHIN, H. S.; LEE, J.; CHOI, C. Y. Effects of LED light spectra on oxidative stress and the protective role of melatonin in relation to the daily rhythm of the yellowtail clownfish, *Amphiprion clarkii*. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 160, n. 2, p. 221–8, 2011.

SIEBEL, A. M.; BONAN, C. D.; SILVA, R. S. DA. Zebrafish como Modelo para Estudos Comportamentais. In: **Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações**. [s.l.: s.n.]. p. 15–55.

SIES, H.; JONES, D. Oxidative Stress. In: **Encyclopedia of Stress**. [s.l.: s.n.]. p. 45–48.

SILVEIRA, T. R. DA; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 2, p. 4–5, 2012.

SILVEIRA, U. S. DA; LOGATO, P. V. R.; PONTES, E. DA C. Fatores estressantes em peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 6, n. 4, p. 1001–1017, 2009.

SIMONNEAUX, V. Generation of the Melatonin Endocrine Message in Mammals: A Review of the Complex Regulation of Melatonin Synthesis by Norepinephrine, Peptides, and Other Pineal Transmitters. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 2, p. 325–95, 2003.

SISON, M.; GERLAI, R. Associative learning performance is impaired in zebrafish (*Danio rerio*) by the NMDA-R antagonist MK-801. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 96, n. 2, p. 230–237, 2011.

SONG, C. et al. Modeling consequences of prolonged strong unpredictable stress in zebrafish: Complex effects on behavior and physiology. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 81, p. 384–394, 2018.

SORENSEN, C. et al. Cortisol reduces cell proliferation in the telencephalon of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Physiology & Behavior**, v. 102, n. 5, p. 518–523, 28 mar. 2011.

SORENSEN, C. et al. Social stress reduces forebrain cell proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Behavioural Brain Research**, v. 227, n. 2, p. 311–318, 14 fev. 2012.

SOUTO, C. N. et al. Visão geral sobre reprodução de peixes teleósteos: da anatomia à sinalização molecular. **PUBVET**, v. 11, n. 11, p. 1175–1187, 2017.

STEWART, A. et al. Neurophenotyping of adult zebrafish using the light/dark box paradigm. **Neuromethods**, v. 51, p. 157–167, 2011.

STEWART, A. M. et al. Perspectives on experimental models of serotonin syndrome in zebrafish. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 6, p. 893–902, 1 maio 2013.

STEWART, A. M. et al. A novel 3D method of locomotor analysis in adult zebrafish: Implications for automated detection of CNS drug-evoked phenotypes. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 255, p. 66–74, 2015.

STOREY, K. B. Oxidative stress: Animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 29, n. 12, p. 1715–1733, 1996.

TAKAKI, K.; RAMAKRISHNAN, L.; BASU, S. A zebrafish model for ocular tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 13, n. 3, p. 1–8, 2018.

TAVARES-DIAS, M. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Amapá: [s.n.].

THOMAS, J. K. et al. Effects of chronic dietary selenomethionine exposure on repeat swimming performance, aerobic metabolism and methionine catabolism in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 130–131, p. 112–122, 2013.

TORT, L. Stress and immune modulation in fish. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 35, n. 12, p. 1366–1375, 2011.

TURNBULL, A. V.; RIVIER, C. L. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Cytokines: Actions and Mechanisms of Action. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 1, p. 1–71, jan. 1999.

VAZ, R. L.; OUTEIRO, T. F.; FERREIRA, J. J. Zebrafish as an animal model for drug discovery in Parkinson's disease and other movement disorders: A systematic review. **Frontiers in Neurology**, v. 9, p. 1–23, 2018.

VELASCO-SANTAMARÍA, Y.; CRUZ-CASALLAS, P. Methodology for Determination of Plasma Cortisol in Fish Using Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa). **MVZ Cordoba**, v. 12, n. 1, p. 869–877, 2007.

VENEGAS, C. et al. Extrapineal melatonin: Analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. **Journal of Pineal Research**, v. 52, p. 217–227, 2012.

VERAS, G. C. et al. Ritmos Biológicos e fotoperíodo em peixes. **Archivos de Zootecnia**, v. 62, p. 25–43, 2013.

VIELMA, J. R. et al. Effects of melatonin on oxidative stress, and resistance to bacterial, parasitic, and viral infections: A review. **Acta Tropica**, v. 137, p. 31–38, 2014.

WAI, M. G. C. et al. A review of pinealectomy-induced melatonin-deficient animal models for the study of etiopathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 9, p. 16484–16499, 2014.

- WANG, Z. et al. Oxidative stress in the zebrafish (*Danio rerio*) under exposure to menadione. **International Conference on Human Health and Biomedical Engineering**, p. 881–884, 2011.
- WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological reviews**, v. 77, n. 3, p. 591–625, 1997.
- WHITMORE, D. et al. Zebrafish Clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. **Nature Neuroscience**, v. 1, p. 701–707, 1998.
- WHITMORE, D.; FOULKES, N. S.; SASSONE-CORSI, P. Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. **Nature**, v. 404, n. 6773, p. 87–91, 2000.
- WILLIAMS, C. H.; HONG, C. C. Multi-Step usage of in Vivo models during rational drug design and discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 4, p. 2262–2274, 2011.
- YANG, L. et al. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. **Reproductive Toxicology**, v. 28, n. 2, p. 245–253, set. 2009.
- YANG, M. et al. Behavior responses of zebrafish (*Danio rerio*) to aquatic environmental stresses in the characteristic of circadian rhythms. **Chemosphere**, v. 210, p. 129–138, 2018.
- YEH, C. M.; GLÖCK, M.; RYU, S. An optimized whole-body cortisol quantification method for assessing stress levels in larval zebrafish. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–8, 2013.
- YUAN, M. et al. Behavioral and Metabolic Phenotype Indicate Personality in Zebrafish (*Danio rerio*). **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 653, 2018.
- ZANG, L.; MADDISON, L. A.; CHEN, W. Zebrafish as a Model for Obesity and Diabetes. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 6, p. 1–13, 2018.
- ZHANG, J. et al. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. **Chemosphere**, v. 55, n. 2, p. 167–74, 2004.
- ZHANG, X. et al. Impairment of the cortisol stress response mediated by the hypothalamus-pituitary-interrenal (HPI) axis in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to monocrotophos pesticide. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 176–177, p. 10–16, 2015.
- ZHDANOVA, I. V. Sleep and its regulation in zebrafish. **Reviews in the Neurosciences**, v. 22, n. 1, p. 27–36, 2011.
- ZHU, X.-Y. et al. A Zebrafish Heart Failure Model for Assessing Therapeutic Agents. **Zebrafish**, v. 15, n. 3, p. 243–253, 2018.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**ARTIGO 1 – O PAPEL DA MELATONINA NA MODULAÇÃO DO ESTRESSE
AGUDO EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Artigo segue as normas do periódico *Physiology & Behavior*, ao qual será submetido.

O papel da melatonina na modulação do estresse agudo em zebrafish (*Danio rerio*)

Luciana C. Lunkes^a; Isadora M. Paiva^b; Renata C. Egger^a; Wesley F. Braga^c; Jaqueline Isaura Alvarez-Leite^c; André R.C.Barreto-Vianna^a; Luis D.S. Murgas^{a*}

^aUniversidade Federal de Lavras, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Departamento de Medicina Veterinária, Lavras, MG, Brasil

^bUniversidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós Graduação em Genética, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, MG, Brasil

^cUniversidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Imunologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Belo Horizonte, MG, Brasil

*Autor correspondente: Luis David Solis Murgas

Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Brasil

Campus Universitário, Caixa postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil

E-mail: lsmurgas@dmv.ufla.br

Telefone: +553538291728

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros hematológicos, hormonais (cortisol), enzimáticos e comportamentais de *zebrafish* que receberam administração de melatonina e foram submetidos ao estresse agudo. 120 *zebrafish wild-type* foram divididos em cinco grupos: controle Naïve (N), controle negativo (C-), controle positivo tratado com diazepam (C+), tratamento com melatonina na dose 1 (Melt. 1) e tratamento com melatonina na dose 2 (Melt. 2). A exposição aos tratamentos nos grupos C+ (0,16mg/l de diazepam), Melt. 1 (6800 nM) e Melt. 2 (13600 nM) foi realizada previamente ao protocolo de estresse, baseado na perseguição com a rede por 5 minutos seguida pela exposição ao ar por 1 minuto. Foram avaliados os parâmetros hematológicos e os níveis de cortisol corporal, bem como o estresse oxidativo (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, espécies reativas de oxigênio e atividade antioxidante) e o comportamento (teste de campo aberto, quantificado pelo *software* EthoVision XT® Noldus). A melatonina foi capaz de modular os efeitos do estresse agudo em *zebrafish* inibindo o aumento dos níveis de cortisol, reduzindo os parâmetros locomotores em geral, induzindo um estado de sono, promovendo linfocitose, reduzindo a peroxidação lipídica e estimulando a atividade enzimática antioxidante.

Palavras-chave: Peixe. Hormônio. Estresse oxidativo. Comportamento. Ansiedade.

1. INTRODUÇÃO

O estresse é uma resposta fisiológica associada a uma cascata de eventos que ocorrem em resposta a um agente ameaçador, onde o organismo tenta resistir à morte e reestabelecer a homeostasia [1]. Os estágios de resposta podem ser classificados em reação de alarme, com fuga, enfrentamento e adaptação; resistência, com superação e recuperação compensatória; e exaustão, quando a exposição ultrapassa em duração e severidade os limites do animal, culminando em condição patológica ou na morte [1–4]. Sempre que um peixe é exposto a um agente estressor, os eixos hipotálamo-sistema nervoso simpático-células cromafins (HSC) e hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI) são ativados, resultando na liberação de catecolaminas e corticosteroides [4,5].

Estressores potenciais para peixes incluem a alteração de temperatura, fotoperíodo, qualidade da água, pH, oxigênio disponível, suprimento alimentar insuficiente, predação, exposição a toxinas e sons, isolamento e perseguição [6–11]. A duração, a magnitude do estresse e sua eventual repetição fazem com que o animal responda de forma diferente, o que inclui mecanismos energéticos, respostas imunológicas e estratégias de aprendizado e

enfrentamento. Quando os recursos não são suficientes para superar o estressor, ocorrem alterações na função imune, na resistência natural a doenças e agentes infecciosos, na taxa de crescimento e de reprodução. [12,13].

A melatonina (N-acetil 5-metoxitriptamina), um hormônio produzido pela glândula pineal, liberado de forma rítmica, que desempenha um papel central no controle de ritmos fisiológicos diários e anuais [14], tem se destacado também por diversos outros efeitos, apesar dos mecanismos de ação ainda não estarem totalmente esclarecidos na literatura. Essa indolamina possui importantes efeitos imunomoduladores, antioxidantes e neuroprotetores [15], desempenha um papel homeostático fundamental nas funções básicas dependentes de cronobiologia, incluindo sono, desenvolvimento, nutrição e reprodução, e também em funções neurais, como aprendizagem e memória [14,16]. A melatonina favorece a redução do estresse oxidativo *in vitro* e *in vivo*, e isso está associado ao seu efeito antioxidante [17,18], bem como em peixes estressados é capaz de reduzir significativamente as concentrações de cortisol no plasma, do teor de glicogênio e da atividade da glicogênio-sintase no fígado e no metabolismo dopaminérgico e serotoninérgico no hipotálamo [19].

O *zebrafish* tem sido muito utilizado em diversos campos específicos de pesquisa para avaliar seu repertório comportamental na compreensão de muitos fenômenos, como ansiedade, respostas ao estresse, síntese de melatonina e regulação através de genes no órgão pineal [11,20–25]. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros hematológicos, hormonais, enzimáticos e comportamentais de *zebrafish* que receberam administração de melatonina e foram submetidos ao estresse agudo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Um total de 120 *zebrafish* (*Danio rerio*) *wild-type* adultos de ambos os sexos ($0,284 \pm 0,13$ g) foram adquiridos de um fornecedor comercial (Muriaé, Minas Gerais, Brasil) e aclimatados durante dez dias na densidade de estocagem de dois animais por litro, na ala de peixes do Biotério Central da Universidade Federal de Lavras, local onde foram conduzidos os procedimentos experimentais. Para a condução dos protocolos, os animais foram divididos em cinco aquários de 20-L com água constantemente aerada, onde a temperatura foi mantida por termostatos a $26^{\circ}\text{C} \pm 2$. O fotoperíodo foi mantido em 14h luz/10h escuro e a alimentação feita três vezes ao dia com ração comercial floculada (Alcon BASIC®, Alcon, Brasil). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (001/2018, CEUA-Unilavras).

Os animais foram divididos em cinco grupos:

- Grupo naïve (N): não submetidos ao estresse nem a qualquer tipo de tratamento;
- Grupo controle negativo (C-): submetidos ao estresse e não submetidos a nenhum tratamento;
- Grupo controle positivo (C+): submetidos ao estresse e tratados com ansiolítico (diazepam);
- Grupo melatonina 1 (Melt. 1): submetidos ao estresse e tratados com melatonina (6800 nM);
- Grupo melatonina 2 (Melt. 2): submetidos ao estresse e tratados com melatonina (13600 nM);

Os peixes foram eutanasiados através da submersão em água gelada (0-4°C) até sua completa imobilização [26]. Todas as amostras foram mantidas congeladas (-80°C) até o momento da sua avaliação, onde permaneceram resfriadas durante todos os procedimentos.

2.2 Protocolos de exposição ao diazepam e à melatonina

Previamente ao estresse agudo, os animais do grupo C+ foram expostos a 0,16 mg/L de diazepam durante 10 minutos, por ser um ansiolítico com efeitos comprovados em *zebrafish* [27,28]. Os animais dos grupos Melt. 1 e Melt. 2 foram previamente expostos a duas diferentes concentrações de melatonina (6800 nM e 13600 nM) durante 20 minutos no período da manhã (8:30h). No intuito de evitar qualquer interferência de possíveis resíduos da água, todos os animais eram transportados para um aquário destinado no momento da exposição ao diazepam e à melatonina. Ao final do protocolo, os mesmos eram transferidos de volta para seus aquários de estoque. Todos os animais em tratamento foram submetidos aos mesmos procedimentos de transporte a fim de evitar quaisquer interferências nos resultados provindas de fatores externos. Imediatamente após a exposição, os animais foram submetidos ao protocolo de estresse agudo.

2.3 Estresse agudo

O estresse agudo foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido previamente por Pavlidis, Theodoridi e Tsalafouta (2015), que consistiu na perseguição dos animais com a rede por 5 minutos e em seguida exposição ao ar por um minuto [9]. Imediatamente após a condução do protocolo de estresse, os animais foram eutanasiados, dando sequência aos procedimentos de coleta.

2.4 Coleta de sangue e análises hematológicas

Após os procedimentos de exposição e estresse agudo, o sangue de oito animais de cada grupo foi obtido através da secção caudal, seguindo o protocolo proposto por Pedroso et al. (2002) [29]. O sangue foi coletado por um tubo capilar heparinizado e utilizado para confecção de lâminas de extensão sanguínea, as quais foram fixadas com metanol e coradas com panótico para contagem diferencial de células sanguíneas de defesa orgânica (trombócitos e leucócitos) [30].

2.5 Avaliação do estresse oxidativo

Para avaliar o perfil enzimático associado ao estresse oxidativo, foi quantificada a atividade das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no corpo inteiro de oito animais de cada grupo. Os resultados foram corrigidos pelos valores de proteína total, que foram obtidos pelo método de Lowry [31]. As amostras de corpo inteiro foram pesadas (com prévia remoção de cabeça e cauda), homogeneizadas em tampão fosfato 50mM gelado (pH = 7,2) e centrifugadas (10500g, 4°C, 10 minutos) para obtenção da fração sobrenadante, onde foram dosados TBARS e ROS e avaliadas as atividades de SOD e CAT.

A peroxidação lipídica foi determinada pela formação de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) [32] onde o malonaldeído (MDA), formado a partir da degradação de ácidos graxos poliinsaturados, foi utilizado como índice para determinação da extensão da reação de peroxidação por reagir com o ácido tiobarbitúrico, formando uma solução de cor avermelhada com absorvância a 535nm. A mensuração foi realizada em microplacas de 96 poços pelo método descrito por Buege e Aust (1978) e o resultado final foi expresso em nmol de MDA/g de proteína.

O teor de radicais livres no corpo inteiro dos animais foi mensurado através do 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA), quantificado utilizando uma curva padrão de 2',7' – diclorofluoresceína (DCF) e os resultados foram expressos como pmol de DCF formado/mg de proteína/minuto [33]. A dosagem da atividade da superóxido dismutase (SOD) é baseada na sua habilidade em catalisar a dismutação de radicais superóxidos (O_2^-) à H_2O_2 e O_2 , diminuindo a razão de auto-oxidação do pirogalol. O resultado é expresso em Unidades por mg de proteína (U/mg proteínas) [34]. A dosagem da atividade de CAT baseia-se no decaimento da absorvância do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) – (A_{240}) pela

decomposição deste pela catalase ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). O resultado é expresso por concentração de proteína (Atividade/mg de proteína) [35].

2.6 Extração do cortisol e análise

O tamanho reduzido do *zebrafish* não permite que os níveis de cortisol sejam analisados através da coleta sanguínea. Sendo assim, seguiu-se a metodologia proposta por diversos autores [23,36–42], a qual baseia-se na quantificação dos níveis do corpo inteiro. Para tal, oito animais de cada grupo foram submetidos a um protocolo de extração seguindo a metodologia proposta por Canavello et al. (2011) [43], onde o cortisol do corpo inteiro foi mensurado em duplicata através do kit de ELISA (Cortisol ELISA kit – USA Diagnóstica), testado e validado para utilização em peixes [44], seguido pelo procedimento de leitura (Leitor de ELISA Biotek®).

2.7 Análises comportamentais

Para analisar as manifestações associadas ao comportamento de ansiedade e estresse, oito animais de cada grupo foram submetidos ao teste de campo aberto [45], que consistiu em colocar o animal em um aquário de polibicarbonato transparente, com dimensões de 11,5cm x 34,5cm x 15,5cm e capacidade para 3-L de água. Em cada aquário foram colocados 2-L de água na temperatura de 26°C, mantendo-se as mesmas condições experimentais. Todos os animais tiveram sua atividade natatória registrada durante 10 minutos sem qualquer interferência, com imagens feitas por câmeras semiprofissionais e ajustes precisos de distância e foco para cada aquário.

Os vídeos foram analisados individualmente através do *software* EthoVision XT® (Noldus). Os primeiros 60 segundos de gravação foram descartados, considerado como tempo de adaptação do animal ao novo ambiente, e apenas os 300 segundos seguintes foram analisados. Os parâmetros avaliados foram o estado de atividade do animal (média de velocidade em cm/s), atividade locomotora (distância percorrida em cm), comportamento tipo-ansioso (percentual de permanência na profundidade do aquário – tempo em segundos), estado de mobilidade (móvel, muito móvel ou imóvel – percentual de tempo em segundos) e momento do primeiro deslocamento até a superfície do aquário (tempo em segundos).

2.8 Análises estatísticas

Os dados foram expressos em médias e desvio padrão. A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-wilk. Para dados normais, utilizou-se ANOVA seguida de

pós-teste com múltiplas comparações de Tukey. Para dados não normais, foi utilizado o teste Kruskal-wallis seguido de pós teste de Dunn's. Todas as análises foram conduzidas com auxílio do programa GraphPad Prism 7.01. Diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Os animais submetidos ao protocolo de estresse agudo, quando comparados ao grupo controle, apresentaram linfopenia ($p = 0,0038$) e trombocitose ($p = 0,0005$). Os peixes que foram tratados com diazepam mantiveram as condições basais, semelhantes ao grupo controle, não diferindo significativamente. O grupo Melt. 1 diferiu significativamente ($p < 0,0001$) do grupo C-, sugerindo uma capacidade da melatonina associada ao estímulo da proliferação de linfócitos (**Figuras 1 e 2**).

O estresse oxidativo foi significativamente ($p < 0,00001$) evidenciado pelo aumento da extensão da peroxidação lipídica (TBARS) nos animais submetidos ao estresse agudo (C-) quando comparados ao controle (N). O diazepam ($p = 0,0004$) e a melatonina nas duas concentrações ($p = 0,0047$; $p = 0,0003$) apresentaram menor formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, não permitindo a ocorrência da peroxidação lipídica (**Figura 3A**).

No grupo de animais submetidos ao estresse agudo (C-), houve aumento significativo ($p = 0,0003$) na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em relação ao grupo controle N. Esse aumento foi impedido no grupo tratado com diazepam (C+) ($p = 0,0003$), o que não aconteceu nos grupos tratados com melatonina (Melt. 1 e Melt. 2) (**Figura 3B**). A atividade da SOD aumentou no grupo tratado com diazepam (C+) de forma significativa ($p = 0,0122$) em relação ao grupo controle N (**Figura 3C**). A atividade da CAT diminuiu de forma significativa ($p = 0,0142$) em relação ao grupo de animais submetidos ao estresse agudo (C-). Nos grupos de animais tratados com diazepam (C+) e melatonina (Melt. 1 e Melt. 2), observa-se que a queda da atividade da CAT foi impedida de forma significativa ($p = 0,0183$; $p = 0,0002$; $p = 0,0003$, respectivamente) (**Figura 3D**).

Houve um aumento de 300% ($p = 0,0262$) dos níveis de cortisol corporal nos animais submetidos ao estresse agudo em comparação ao controle. A exposição ao diazepam inibiu o aumento dos níveis de cortisol em comparação aos animais submetidos ao estresse ($p < 0,0001$), bem como o mesmo efeito foi observado nos animais expostos à melatonina na concentração mais alta (13600 nM) ($p = 0,0254$) (**Figura 4**).

No estado de atividade e na atividade locomotora, a melatonina na concentração mais alta foi capaz de reduzir de forma significativa as médias de velocidade ($p = 0,0249$) e

distância percorrida ($p = 0,0238$) dos animais submetidos ao estresse agudo (**Figura 5A, 5B**). Para o comportamento tipo-ansioso, caracterizado pela permanência do animal na profundidade do aquário a maior parte do tempo, o diazepam não foi capaz de promover efeitos. A melatonina na concentração maior promoveu um maior tempo de permanência dos animais na profundidade do aquário ($p = 0,0004$) em relação aos animais submetidos ao estresse (**Figura 5C**). Isso pôde ser comprovado pelo maior tempo em que o animal permaneceu imóvel ($p = 0,0017$) (**Figura 5D**), bem como o tempo médio de ida até a superfície do aquário pela primeira vez, que diferiu significativamente de todos os outros grupos (**Figura 5E**). Portanto, não é possível sugerir um efeito ansiogênico da maior concentração de melatonina nos animais submetidos ao estresse agudo, mas sim a promoção de um estado de sono.

4. DISCUSSÃO

Os resultados evidenciaram que a melatonina promove efeitos na atenuação das variáveis associadas ao estresse agudo em *zebrafish*, alterando o perfil hematológico promovendo linfocitose, reduzindo o estresse oxidativo associado à peroxidação lipídica, estimulando a atividade antioxidante através da enzima CAT e inibindo o aumento dos níveis de cortisol corporal. Além disso, a melatonina induz um estado de sono nesses animais, diminuindo os parâmetros locomotores de forma geral.

O cortisol é um dos biomarcadores de estresse mais utilizados devido sua importante atuação ao longo dos eventos associados à resposta do animal frente a uma situação de perigo. Em *zebrafish*, é um excelente indicador [37,46]. Para os animais submetidos ao estresse agudo, os níveis de cortisol corporal aumentaram significativamente, constatando a validação do modelo de estresse agudo de forma semelhante ao encontrado na literatura [23,30,46–48]. O cortisol participa do processo adaptativo apresentando funções mineralocorticoides e glicocorticoides, e devido a sua facilidade de difusão, seus níveis aumentam em poucos minutos e retornam aos níveis basais em até 24 horas [4,49]. O grupo C+ impediu o aumento dos níveis de cortisol de forma significativa quando comparado ao grupo controle submetido ao estresse agudo, sugerindo, portanto, uma supressão dessa condição causada pelo ansiolítico. Em *zebrafish*, a exposição aguda ao diazepam inibiu o estresse associado ao cortisol [27]. A melatonina na concentração mais alta (13600 nM) foi capaz de impedir o aumento dos níveis de cortisol, sugerindo um efeito supressor, atenuando os efeitos do estresse de forma significativa quando comparado ao grupo controle estressado, como já reportado pela literatura [19].

Os resultados das variáveis comportamentais associados ao estado de atividade (média de velocidade) e à atividade locomotora (distância percorrida) traduzem um perfil de animais que, quando colocados em um ambiente desconhecido, assumem um comportamento inato de fuga, inicialmente associado a um maior tempo de permanência na profundidade, seguido pela exploração vertical, movimentos erráticos e episódios de congelamento ou *freezing* [50]. Dessa forma, independentemente de haver uma fonte estressora ou não, um animal colocado em um novo aquário tende a se locomover mais. Essa hipótese justifica não terem sido encontrados aumentos significativos nesses parâmetros no grupo de animais submetidos ao estresse (C-) quando comparados aos controles (N e C+). Em contrapartida, a melatonina na maior concentração reduziu significativamente ambos os parâmetros locomotores.

No *zebrafish* o comportamento tipo-ansioso caracteriza-se pela permanência do animal a maior parte do tempo na profundidade do aquário, fugindo da superfície [50,51]. No entanto, não necessariamente animais estressados apresentam comportamento característico de ansiedade, o que pode ser evidenciado pelo fato de que o diazepam não afetou o comportamento de forma significativa. De forma semelhante, Giacomini et al. (2016) apontaram alterações nos níveis de cortisol em resposta ao tratamento com diazepam, porém, o ansiolítico também não foi capaz de promover alterações no comportamento dos animais [52]. Esse resultado evidencia a importância de relacionar variáveis bioquímicas e comportamentais, o que é essencial para a melhor compreensão de todo o processo, já que indicativos bioquímicos nem sempre são representados a nível comportamental.

A melatonina na maior concentração fez com que os animais passassem a maior parte do tempo na profundidade do aquário, o que sugeriria um efeito ansiogênico. Porém, ao analisar o tempo em que o animal permaneceu imóvel, bem como o tempo em que levou para ir pela primeira vez até a superfície do aquário, é possível afirmar que os animais assumiram um estado de sono, já que houveram diferenças significativas em relação aos grupos controle. Esse estado de sono mediado pela ativação de receptores de membrana específicos foi evidenciado como um possível efeito da melatonina em *zebrafish* [53].

O perfil hematológico dos animais submetidos ao estresse contribuiu para a validação do modelo por associar-se à linfopenia e trombocitose, como descrito pela literatura [54–56], inclusive em *zebrafish* submetidos a um protocolo agudo de exposição ao ar [30]. Enquanto a trombocitose pode ser resultado da contração esplênica, a linfopenia ocorre devido ao deslocamento imediato de linfócitos no sangue circulante para outros tecidos [30], podendo sofrer interferência dos glicocorticoides, que induzem a apoptose linfóide e tem seus níveis aumentados em uma condição de estresse [57–59]. O grupo C+ tratado com diazepam teve o

perfil de contagem de células sanguíneas bem semelhante ao grupo N, ou seja, às condições basais, o que foi importante para validá-lo como grupo controle positivo. Uma exposição crônica ao diazepam sugere alterações mais significativas no perfil hematológico em peixes, como reduções nos glóbulos vermelhos (hemácias), na contagem de hemoglobina e no volume celular, além de uma tendência inversa associada aos glóbulos brancos [60].

A linfocitose observada nos animais do grupo Melt. 1 em relação ao grupo controle, em conjunto com a aproximação dos resultados do percentual de trombócitos dos grupos Naïve e C+, caracterizaram um perfil fisiológico pré-inflamatório. A melatonina estimula a proliferação de linfócitos e tende a melhorar os níveis de trombócitos [61]. Em peixes, os trombócitos auxiliam na coagulação sanguínea de forma semelhante ao que acontece nos mamíferos, bem como atuam através da atividade fagocítica na função de defesa [62], reduzindo a predisposição a infecções [63].

O estresse oxidativo ocorre sempre que a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH \cdot), o radical hidroperoxila (OOH \cdot) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), excede a capacidade dos sistemas de defesa antioxidante para neutralizá-las ou eliminá-las [64,65], resultando em danos a moléculas biológicas. Essa possibilidade de danificar as membranas celulares e as lipoproteínas ocorre através da peroxidação lipídica [66], uma das principais contribuintes para a perda da função celular sob estresse oxidativo [67]. As TBARS traduzem a extensão da peroxidação lipídica [68], e foi observado que seus níveis aumentaram significativamente no grupo de animais submetidos ao estresse agudo (C-) quando comparado ao controle (Naïve), reafirmando a validação do modelo. Os grupos tratados com diazepam e melatonina tiveram reduções significativas nos níveis de MDA quando comparados ao grupo controle estressado (C-). Portanto, além da semelhança entre os grupos N e C+, houve um efeito protetor da melatonina em ambas as concentrações testadas associado a uma possível atuação antioxidante, suprimindo o estresse oxidativo [19,69].

O aumento na formação das espécies reativas de oxigênio no grupo C- em relação ao Naïve também foi importante para a validação do modelo de estresse. Esse aumento parece ter sido impedido pelo diazepam, mas não pela melatonina. Substâncias antioxidantes auxiliam na prevenção dos danos celulares, podendo ser enzimas ou moléculas [70], como a SOD e a CAT, que auxiliam na defesa antioxidante em uma situação de estresse [71]. No grupo C+, o diazepam foi capaz de aumentar a atividade da SOD e impedir a queda da atividade da CAT. A SOD faz com que o composto superóxido se transforme em H_2O_2 , enquanto, a CAT, com sua atividade mantida, degrada o H_2O_2 em O_2 e H_2O . Portanto, para os

animais tratados com diazepam, não ocorreu um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), nem um conseqüente aumento da peroxidação lipídica (TBARS). Nos animais tratados com melatonina (Melt. 1 e Melt. 2), a atividade da SOD não variou, o que justifica o aumento da produção de ROS mesmo com a diminuição da peroxidação lipídica. Com a atividade da CAT mantida nesses grupos, a enzima apenas degrada o H_2O_2 , principal precursor da peroxidação lipídica, mas ainda permite a formação das outras espécies reativas de oxigênio devido a presença do superóxido.

Em relação a SOD e a CAT é possível considerar que existem diversas vias onde essas enzimas podem estar inseridas, sendo facilmente alteradas pelos mais diversos estímulos. Estudos anteriores demonstram que a atuação da melatonina associa-se a diferentes mecanismos em diferentes doses, onde concentrações mais baixas estão relacionadas a uma ação protetora dependente da ativação de seus receptores e do aumento da defesa antioxidante, enquanto concentrações mais altas induzem a ação neutralizadora ou “scavenger” de radicais livres [72]. Portanto, a melatonina possui duas vias de atuação no estresse oxidativo, uma diretamente sobre a eliminação das espécies reativas de oxigênio, e outra estimulando o efeito de enzimas antioxidantes [69]. Assim, nos animais tratados com melatonina, pode ter havido um estímulo da SOD de forma semelhante àquele dado pela condição de estresse, fazendo com que os níveis se aproximassem. Já em relação à CAT, a atividade foi mantida, ou seja, é possível considerar uma via de estímulo antioxidante. Entretanto, no geral, os animais apresentaram um perfil ideal para reduzir o estresse oxidativo.

O ineditismo deste trabalho contribui para um melhor entendimento das concentrações adequadas de melatonina para *zebrafish*. A maior concentração de melatonina foi capaz de promover efeitos significativos na atenuação do estresse, quantificados pelas variáveis bioquímicas, mas também culminou em um estado de sono verificado a nível comportamental. Apesar dos efeitos do estresse serem negativos, animais em estado de sono também não apresentam um comportamento adequado. Portanto, os efeitos da melatonina ainda precisam ser melhor investigados, principalmente no que diz respeito às vias de atuação, às concentrações e ao tempo de exposição, a relação com outros hormônios e sua aplicabilidade em humanos. Além disso, os resultados encontrados neste estudo permitem afirmar que o *zebrafish* é um modelo válido para pesquisas com estresse agudo.

5. CONCLUSÃO

A melatonina modula os efeitos do estresse em relação ao perfil hematológico (linfocitose), redução da peroxidação lipídica, estímulo da atividade enzimática antioxidante, inibição do aumento dos níveis de cortisol e redução dos parâmetros locomotores, induzindo um estado de sono.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Rede Mineira de Bioterismo, da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

- [1] C.B. Schreck, L. Tort, The Concept of Stress in Fish, in: Fish Physiology, First Edit, Elsevier Inc., 2016: pp. 1–34. doi:10.1016/B978-0-12-802728-8.00001-1.
- [2] H. Selye, Stress and the general adaptation syndrome., British Medical Journal. 1 (1950) 1383–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15426759> (accessed September 3, 2018).
- [3] H. Selye, Homeostasis and heterostasis., Perspectives in Biology and Medicine. 16 (1973) 441–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4705073> (accessed September 3, 2018).
- [4] E.T. Oba, W. dos S. Mariano, L.R.B. dos Santos, Estresse em peixes cultivados: Agravantes e atenuantes para manejo, in: Manejo e Sanidade de Peixes Em Cultivo, Macapá, 2009: pp. 226–247. <https://www.researchgate.net/publication/312456226> (accessed September 9, 2018).
- [5] S.E. Wendelaar Bonga, The stress response in fish, Physiological Reviews. 77 (1997) 591–625. doi:stress physiologie comportement cortisol cerveau hypophyse catecholamine osmoregulation branchie.
- [6] B.A. Barton, Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids, Integrative and Comparative Biology. 42 (2002) 517–525. doi:10.1093/icb/42.3.517.

- [7] L. Tort, Stress and immune modulation in fish, *Developmental and Comparative Immunology*. 35 (2011) 1366–1375. doi:10.1016/j.dci.2011.07.002.
- [8] C.H. Cheng, F.F. Yang, R.Z. Ling, S.A. Liao, Y.T. Miao, C.X. Ye, A.L. Wang, Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (*Takifugu obscurus*), *Aquatic Toxicology*. 164 (2015) 61–71. doi:10.1016/j.aquatox.2015.04.004.
- [9] M. Pavlidis, A. Theodoridi, A. Tsalafouta, Neuroendocrine regulation of the stress response in adult zebrafish, *Danio rerio*, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 60 (2015) 121–131. doi:10.1016/j.pnpbp.2015.02.014.
- [10] Y. Han, T. Liu, J. Wang, J. Wang, C. Zhang, L. Zhu, Genotoxicity and oxidative stress induced by the fungicide azoxystrobin in zebrafish (*Danio rerio*) livers, *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 133 (2016) 13–19. doi:10.1016/j.pestbp.2016.03.011.
- [11] C. Song, B.P. Liu, Y.P. Zhang, Z. Peng, J.J. Wang, A.D. Collier, D.J. Echevarria, K. V. Savelieva, R.F. Lawrence, C.S. Rex, D.A. Meshalkina, A. V. Kalueff, Modeling consequences of prolonged strong unpredictable stress in zebrafish: Complex effects on behavior and physiology, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 81 (2018) 384–394. doi:10.1016/j.pnpbp.2017.08.021.
- [12] S.M. Korte, B. Olivier, J.M. Koolhaas, A new animal welfare concept based on allostasis, *Physiology & Behavior*. 92 (2007) 422–428. doi:10.1016/j.physbeh.2006.10.018.
- [13] C.B. Schreck, Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis, *General and Comparative Endocrinology*. 165 (2010) 549–556. doi:10.1016/j.ygcen.2009.07.004.
- [14] E. Lima-Cabello, M.E. Díaz-Casado, J.A. Guerrero, B.B. Ojalora, G. Escames, L.C. López, R.J. Reiter, D. Acuña-Castroviejo, A review of the melatonin functions in zebrafish physiology, *Journal of Pineal Research*. 57 (2014) 1–9. doi:10.1111/jpi.12149.
- [15] J.R. Vielma, E. Bonilla, L. Chacín-Bonilla, M. Mora, S. Medina-Leendertz, Y. Bravo, Effects of melatonin on oxidative stress, and resistance to bacterial, parasitic, and viral infections: A review, *Acta Tropica*. 137 (2014) 31–38.

doi:10.1016/j.actatropica.2014.04.021.

- [16] K. Howe, M.D. Clark, C.F. Torroja, J. Torrance, C. Berthelot, M. Muffato, J.E. Collins, S. Humphray, K. McLaren, L. Matthews, S. McLaren, I. Sealy, M. Caccamo, C. Churcher, C. Scott, J.C. Barrett, R. Koch, G.J. Rauch, S. White, W. Chow, B. Kilian, L.T. Quintais, J.A. Guerra-Assunção, Y. Zhou, Y. Gu, J. Yen, J.H. Vogel, T. Eyre, S. Redmond, R. Banerjee, J. Chi, B. Fu, E. Langley, S.F. Maguire, G.K. Laird, D. Lloyd, E. Kenyon, S. Donaldson, H. Sehra, J. Almeida-King, J. Loveland, S. Trevanion, M. Jones, M. Quail, D. Willey, A. Hunt, J. Burton, S. Sims, K. McLay, B. Plumb, J. Davis, C. Clee, K. Oliver, R. Clark, C. Riddle, D. Elliott, G. Threadgold, G. Harden, D. Ware, B. Mortimer, G. Kerry, P. Heath, B. Phillimore, A. Tracey, N. Corby, M. Dunn, C. Johnson, J. Wood, S. Clark, S. Pelan, G. Griffiths, M. Smith, R. Glithero, P. Howden, N. Barker, C. Stevens, J. Harley, K. Holt, G. Panagiotidis, J. Lovell, H. Beasley, C. Henderson, D. Gordon, K. Auger, D. Wright, J. Collins, C. Raisen, L. Dyer, K. Leung, L. Robertson, K. Ambridge, D. Leongamornlert, S. McGuire, R. Gilderthorp, C. Griffiths, D. Manthavadi, S. Nichol, G. Barker, S. Whitehead, M. Kay, J. Brown, C. Murnane, E. Gray, M. Humphries, N. Sycamore, D. Barker, D. Saunders, J. Wallis, A. Babbage, S. Hammond, M. Mashreghi-Mohammadi, L. Barr, S. Martin, P. Wray, A. Ellington, N. Matthews, M. Ellwood, R. Woodmansey, G. Clark, J. Cooper, A. Tromans, D. Grafham, C. Skuce, R. Pandian, R. Andrews, E. Harrison, A. Kimberley, J. Garnett, N. Fosker, R. Hall, P. Garner, D. Kelly, C. Bird, S. Palmer, I. Gehring, A. Berger, C.M. Dooley, Z. Ersan-Ürün, C. Eser, H. Geiger, M. Geisler, L. Karotki, A. Kirn, J. Konantz, M. Konantz, M. Oberländer, S. Rudolph-Geiger, M. Teucke, K. Osoegawa, B. Zhu, A. Rapp, S. Widaa, C. Langford, F. Yang, N.P. Carter, J. Harrow, Z. Ning, J. Herrero, S.M.J. Searle, A. Enright, R. Geisler, R.H.A. Plasterk, C. Lee, M. Westerfield, P.J. De Jong, L.I. Zon, J.H. Postlethwait, C. Nüsslein-Volhard, T.J.P. Hubbard, H.R. Crollius, J. Rogers, D.L. Stemple, The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome, *Nature*. 496 (2013) 498–503. doi:10.1038/nature12111.
- [17] H.S. Shin, J. Lee, C.Y. Choi, Effects of LED light spectra on oxidative stress and the protective role of melatonin in relation to the daily rhythm of the yellowtail clownfish, *Amphiprion clarkii*, *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*. 160 (2011) 221–8. doi:10.1016/j.cbpa.2011.06.002.

- [18] C.A.G.D.M. Dias, D.S. Fagundes, A. Gouveia Junior, M.D.M. Lopez de Silanes, J.C. Sá-Oliveira, Luz, Melatonina E Estresse Oxidativo Na Piscicultura, *Biota Amazônia*. 3 (2013) 169–176.
- [19] M. Conde-Sieira, J.L.P. Muñoz, M.A. López-Patiño, M. Gesto, J.L. Soengas, J.M. Míguez, Oral administration of melatonin counteracts several of the effects of chronic stress in rainbow trout, *Domestic Animal Endocrinology*. 46 (2014) 26–36. doi:10.1016/j.domaniend.2013.10.001.
- [20] S. Saha, K.M. Singh, B. Bansh, P. Gupta, Melatonin synthesis and clock gene regulation in the pineal organ of teleost fish compared to mammals: Similarities and differences, *General and Comparative Endocrinology*. (2018).
- [21] F.S. Dametto, D. Fior, R. Idalencio, J.G.S. Rosa, M. Fagundes, A. Marqueze, R.E. Barreto, A. Piato, L.J.G. Barcellos, Feeding regimen modulates zebrafish behavior, *PeerJ*. 6 (2018) 1–17. doi:10.7717/peerj.5343.
- [22] A. Stewart, C. Maximino, T.M. De Brito, A.M. Herculano, A. Gouveia, S. Morato, J.M. Cachat, S. Gaikwad, M.F. Elegante, P.C. Hart, A. V. Kalueff, Neurophenotyping of adult zebrafish using the light/dark box paradigm, *Neuromethods*. 51 (2011) 157–167. doi:10.1007/978-1-60761-953-6_13.
- [23] R. Cortés, M. Teles, M. Oliveira, J.M. Cerdá-reverter, Effects of acute handling stress on short-term central expression of orexigenic / anorexigenic genes in zebrafish, *Fish Physiology and Biochemistry*. 44 (2018) 257–272.
- [24] M. Marcon, R. Mocelin, A. Sachett, A.M. Siebel, A.P. Herrmann, A. Piato, Enriched environment prevents oxidative stress in zebrafish submitted to unpredictable chronic stress, *PeerJ*. 6 (2018) 1–15. doi:10.7717/peerj.5136.
- [25] L. Pancotto, R. Mocelin, M. Marcon, A.P. Herrmann, A. Piato, Anxiolytic and anti-stress effects of acute administration of acetyl-L-carnitine in zebrafish, *PeerJ*. 6 (2018) 1–18. doi:10.7717/peerj.5309.
- [26] Guidelines for Use of Zebrafish in the NIH Intramural Research Program, (2016) 1–3.
- [27] M.S. De Abreu, G. Koakoski, D. Ferreira, T. Acosta Oliveira, J.G. Santos Da Rosa, D. Gusso, A.C. Varrone Giacomini, A.L. Piato, L.J.G. Barcellos, Diazepam and fluoxetine

- decrease the stress response in zebrafish, *PLoS ONE*. 9 (2014) 1–5.
doi:10.1371/journal.pone.0103232.
- [28] D.L. Gebauer, N. Pagnussat, Â.L. Piato, I.C. Schaefer, C.D. Bonan, D.R. Lara, Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 99 (2011) 480–486.
doi:10.1016/j.pbb.2011.04.021.
- [29] G.L. Pedroso, T.O. Hammes, T.D.C. Escobar, L.B. Fracasso, L.F. Forgiarini, T.R. da Silveira, Blood Collection for Biochemical Analysis in Adult Zebrafish, *Journal of Visualized Experiments*. 63 (2012) 1–3. doi:10.3791/3865.
- [30] A.K. Grzelak, D.J. Davis, S.M. Caraker, M.J. Crim, J.M. Spitsbergen, C.E. Wiedmeyer, Stress leukogram induced by acute and chronic stress in zebrafish (*Danio rerio*), *Comparative Medicine*. 67 (2017) 263–269.
- [31] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent., *The Journal of Biological Chemistry*. (1951). doi:10.1016/0304-3894(92)87011-4.
- [32] J.A. Buege, S.D. Aust, Microsomal lipid peroxidation, *Methods in Enzymology*. 52 (1978) 302–10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/672633> (accessed August 27, 2018).
- [33] A.S. Driver, P.R.S. Kodavanti, W.R. Mundy, Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates, *Neurotoxicology and Teratology*. (2000). doi:10.1016/S0892-0362(99)00069-0.
- [34] S. Dieterich, U. Bieligk, K. Beulich, G. Hasenfuss, J. Prestle, Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart : Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart, *Circulation*. 101 (2000) 33–9. doi:10.1161/01.CIR.101.1.33.
- [35] H. Aebi, Catalase in Vitro, *Methods in Enzymology*. (1984). doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- [36] A.K.S. Dhanasiri, J.M.O. Fernandes, V. Kiron, Liver Transcriptome Changes in Zebrafish during Acclimation to Transport-Associated Stress, *PLoS ONE*. 8 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0065028.

- [37] M. Gesto, J. Hernández, M.A. López-Patiño, J.L. Soengas, J.M. Míguez, Is gill cortisol concentration a good acute stress indicator in fish? A study in rainbow trout and zebrafish, *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*. 188 (2015) 65–69. doi:10.1016/j.cbpa.2015.06.020.
- [38] C.L. Rambo, R. Mocelin, M. Marcon, D. Villanova, G. Koakoski, M.S. de Abreu, T.A. Oliveira, L.J.G. Barcellos, A.L. Piato, C.D. Bonan, Gender differences in aggression and cortisol levels in zebrafish subjected to unpredictable chronic stress, *Physiology and Behavior*. 171 (2017) 50–54. doi:10.1016/j.physbeh.2016.12.032.
- [39] D.G. Sfakianakis, I. Leris, M. Kentouri, Exercise-related muscle lactate metabolism in zebrafish juveniles : The effect of early life temperature, *Italian Journal of Zoology*. 79 (2012) 568–573. doi:10.1080/11250003.2012.713032.
- [40] J.K. Thomas, S. Wiseman, J.P. Giesy, D.M. Janz, Effects of chronic dietary selenomethionine exposure on repeat swimming performance, aerobic metabolism and methionine catabolism in adult zebrafish (*Danio rerio*), *Aquatic Toxicology*. 130–131 (2013) 112–122. doi:10.1016/j.aquatox.2013.01.009.
- [41] C.M. Yeh, M. Glöck, S. Ryu, An optimized whole-body cortisol quantification method for assessing stress levels in larval zebrafish, *PLoS ONE*. 8 (2013) 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0079406.
- [42] X. Zhang, Y. Zhong, H. Tian, W. Wang, S. Ru, Impairment of the cortisol stress response mediated by the hypothalamus-pituitary-interrenal (HPI) axis in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to monocrotophos pesticide, *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*. 176–177 (2015) 10–16. doi:10.1016/j.cbpc.2015.07.003.
- [43] P.R. Canavello, J.M. Cachat, E.C. Beeson, A. Laffoon, L., C. Grimes, W.A.M. Haymore, M.F. Elegante, B.K. Bartels, P.C. Hart, S.I. Elkhayat, D.H. Tien, S. Mohnot, H. Amri, A. V. Kalueff, *Neuromethods: Preface*, *Neuromethods*. 51 (2011) 135–142. doi:10.1007/978-1-60761-953-6.
- [44] Y. Velasco-Santamaría, P. Cruz-Casallas, Methodology for Determination of Plasma Cortisol in Fish Using Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa), *MVZ Cordoba*. 12 (2007) 869–877.

- [45] A.M. Siebel, C.D. Bonan, R.S. da Silva, Zebrafish como Modelo para Estudos Comportamentais, in: *Biotecnologia Aplicada à Saúde: Fundamentos e Aplicações*, 2015: pp. 15–55.
- [46] J.M. Ramsay, G.W. Feist, Z.M. Varga, M. Westerfield, M.L. Kent, C.B. Schreck, Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult zebrafish, *Danio rerio*, *Aquaculture*. 258 (2006) 565–574. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.04.020.
- [47] S. Shams, D. Seguin, A. Facciol, D. Chatterjee, R. Gerlai, Effect of social isolation on anxiety-related behaviors, cortisol, and monoamines in adult zebrafish, *Behavioral Neuroscience*. 131 (2017) 492–504. doi:10.1037/bne0000220.
- [48] J.M. Ramsay, G.W. Feist, Z.M. Varga, M. Westerfield, M.L. Kent, C.B. Schreck, Whole-body cortisol response of zebrafish to acute net handling stress, *Aquaculture*. 297 (2009) 157–162.
- [49] B.A. Barton, G.K. Iwama, Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids, *Annual Review of Fish Diseases*. 1 (1991) 3–26. doi:10.1016/0959-8030(91)90019-G.
- [50] E. V. Kysil, D.A. Meshalkina, E.E. Frick, D.J. Echevarria, D.B. Rosemberg, C. Maximino, M.G. Lima, M.S. Abreu, A.C. Giacomini, L.J.G. Barcellos, C. Song, A. V. Kalueff, Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests Elana, *Zebrafish*. 14 (2017) 1–12. doi:10.1089/zeb.2016.1415.
- [51] J. Cachat, A. Stewart, L. Grossman, S. Gaikwad, F. Kadri, K.M. Chung, N. Wu, K. Wong, S. Roy, C. Suci, J. Goodspeed, M. Elegante, B. Bartels, S. Elkhayat, D. Tien, J. Tan, A. Denmark, T. Gilder, E. Kyzar, J. Dileo, K. Frank, K. Chang, E. Utterback, P. Hart, A. V Kalueff, Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish., *Nature Protocols*. 5 (2010) 1786–1799. doi:10.1038/nprot.2010.140.
- [52] A.C.V.V. Giacomini, M.S. Abreu, L. V. Giacomini, A.M. Siebel, F.F. Zimmerman, C.L. Rambo, R. Mocelin, C.D. Bonan, A.L. Piato, L.J.G. Barcellos, Fluoxetine and diazepam acutely modulate stress induced-behavior, *Behavioural Brain Research*. 296 (2016) 301–310. doi:10.1016/j.bbr.2015.09.027.
- [53] I. V Zhdanova, S.Y. Wang, O.U. Leclair, N.P. Danilova, Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish, *Brain Research*. 903 (2001) 263–268. doi:10.1016/S0006-

8993(01)02444-1.

- [54] G.A. Wedemeyer, D. McLeay, C.P. Goodyear, Assessing the tolerance of fish and fish populations to environmental stress: The problems and methods of monitoring, (1984) 164–195. <https://pubs.er.usgs.gov/publication/70162173> (accessed September 3, 2018).
- [55] P.T. Dick, D.G. Dixon, Changes in circulating blood cell levels of rainbow trout, *Sulmo gairdneri* Richardson, following acute and chronic exposure to copper, *Journal of Fish Biology*. 26 (1985) 475–481.
- [56] S.G. Ruparelia, Y. Verma, S.R. Saiyed, U.M. Rawal, Effect of Cadmium on Blood of Tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), During Prolonged Exposure, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 45 (1990) 305–312.
- [57] R.A. Schwartzman, J.A. Cidlowski, Glucocorticoid-induced Apoptosis of Lymphoid Cells, *International Archives of Allergy and Immunology*. 105 (1994) 347–354. doi:10.1159/000236781.
- [58] B.M.L. Verburg-Van Kemenade, B. Nowak, M.Y. Engelsma, F.A.A. Weyts, Differential effects of cortisol on apoptosis and proliferation of carp B-lymphocytes from head kidney, spleen and blood, *Fish & Shellfish Immunology*. 9 (1999) 405–415. doi:10.1006/FSIM.1998.0197.
- [59] F.A. Weyts, G. Flik, B.M. Verburg-van Kemenade, Cortisol inhibits apoptosis in carp neutrophilic granulocytes, *Developmental and Comparative Immunology*. 22 (1998) 563–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9877437> (accessed September 3, 2018).
- [60] E.O. Ogueji, C.D. Nwani, S.C. Iheanacho, C.E. Mbah, B.U. Ibrahim, Hematological alterations in the african catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles exposed to sub-chronic concentrations of diazepam, *Nigeria Journal of Fisheries*. 14 (2017).
- [61] M.Á. Esteban, A. Cuesta, E. Chaves-Pozo, J. Meseguer, Influence of melatonin on the immune system of fish: A review, *International Journal of Molecular Sciences*. 14 (2013) 7979–7999. doi:10.3390/ijms14047979.
- [62] M. Tavares-Dias, J.F.B. Melo, G. Moraes, F.R. de Moraes, Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do Jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae), *Ciência Rural*. 32 (2002) 693–698.

- [63] I.K. Ueda, M.I. Egami, W. da S. Sasso, E.R. Matushima, Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis (Tilapia) niloticus*. (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei): part II, *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 38 (2001) 273–277. doi:10.1590/S1413-95962001000600005.
- [64] H. Sies, Oxidative Stress, in: *Oxidative Stress*, Elsevier, 1985: pp. 1–8. doi:10.1016/B978-0-12-642760-8.50005-3.
- [65] A. Agarwal, R.A. Saleh, M.A. Bedaiwy, Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction., *Fertility and Sterility*. 79 (2003) 829–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12749418> (accessed October 13, 2018).
- [66] M. Martínez-Cayuela, Oxygen free radicals and human disease, *Biochimie*. 77 (1995) 147–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7647106> (accessed October 13, 2018).
- [67] K.B. Storey, Oxidative stress: Animal adaptations in nature, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 29 (1996) 1715–1733.
- [68] M. Bartoskova, R. Dobsikova, V. Stancova, O. Pana, D. Zivna, L. Plhalova, J. Blahova, P. Marsalek, Norfloxacin - Toxicity for Zebrafish (*Danio rerio*) focused on oxidative stress parameters, *BioMed Research International*. 2014 (2014). doi:10.1155/2014/560235.
- [69] D. Bonnefont-Rousselot, F. Collin, Melatonin: Action as antioxidant and potential applications in human disease and aging, *Toxicology*. 278 (2010) 55–67. doi:10.1016/j.tox.2010.04.008.
- [70] M. Bartoskova, R. Dobsikova, V. Stancova, D. Zivna, J. Blahova, P. Marsalek, L. Zelnickova, M. Bartos, F.C. Di Tocco, C. Faggio, Evaluation of ibuprofen toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of oxidative stress, *Neuroendocrinology Letters*. 34 (2013) 102–108.
- [71] Z. Wang, Z. Sun, W. Song, J. Guo, W. He, F. Ding, Oxidative stress in the zebrafish (*Danio rerio*) under exposure to menadione, *International Conference on Human Health and Biomedical Engineering*. (2011) 881–884. doi:10.1109/HHBE.2011.6028963.
- [72] V. Martín, A.M. Sanchez-Sanchez, N. Puente-Moncada, M. Gomez-Lobo, M.A.

Alvarez-Vega, I. Antolín, C. Rodríguez, Involvement of autophagy in melatonin-induced cytotoxicity in glioma-initiating cells, *Journal of Pineal Research*. 57 (2014) 308–316. doi:10.1111/jpi.12170.

Legendas das Figuras

Figura 1. Para a contagem diferencial de células sanguíneas, utiliza-se 100 células em cada lâmina para estabelecimento do percentual de cada componente celular, sendo considerados trombócitos, linfócitos, eosinófilos, monócitos, neutrófilos, basófilos e leucócitos granulares. (A) Seta apontando um leucócito granular. (B) Seta apontando um neutrófilo. (C) Seta apontando um linfócito. (D) Seta da esquerda apontando um neutrófilo e da direita um linfócito. (E) Seta apontando um monócito. (F) Seta apontando um basófilo.

Figura 2. Perfil hematológico envolvendo células de defesa sanguínea de *zebrafish* submetidos ao estresse agudo (C-) e tratados com diazepam (C+) e melatonina (Melt. 1; Melt. 2). (A) Percentual de linfócitos no sangue. (B) Percentual de trombócitos no sangue. *Two-way* ANOVA seguido pelo teste de múltiplas comparações de Tukey. * significa diferença estatística determinada por $p < 0,05$. Naïve: grupo controle.

Figura 3. Perfil enzimático associado à formação de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). *One-way* ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey. * significa diferença estatística determinada por $p < 0,05$. Naïve: grupo controle.

Figura 4. Níveis de cortisol corporal (ng / g) de *zebrafish* submetidos ao estresse agudo (C-) e tratados com diazepam (C+) e melatonina (Melt. 1; Melt. 2). Kruskal-wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn's. * significa diferença estatística determinada por $p < 0,05$. Naïve: grupo controle.

Figura 5. Variáveis comportamentais analisadas em *zebrafish* submetidos ao estresse agudo (C-) e tratados com diazepam (C+) e melatonina (Melt. 1; Melt. 2). (A) Atividade locomotora (média de velocidade em cm / s). (B) Estado de atividade (distância percorrida em cm). (C) Comportamento tipo-ansioso (percentual de permanência na profundidade em s). (D) Estado de mobilidade (percentual de tempo imóvel). (E) Momento da primeira visita à superfície do aquário (s). Kruskal-wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn's. * significa diferença estatística determinada por $p < 0,05$. Naïve: grupo controle.

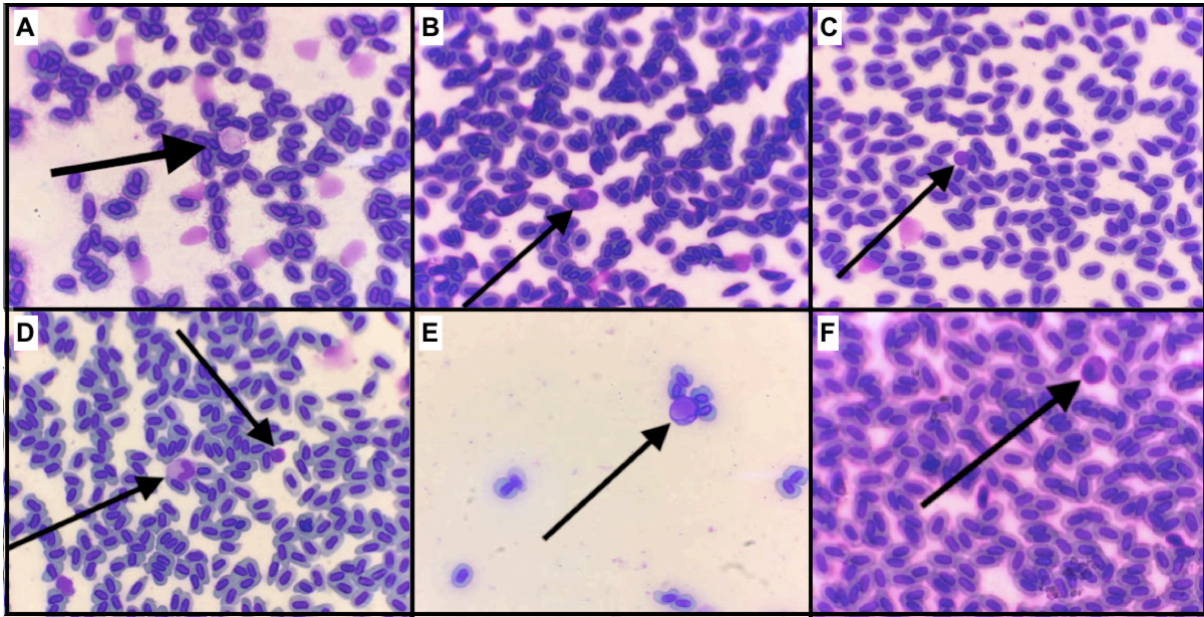


Figura 1

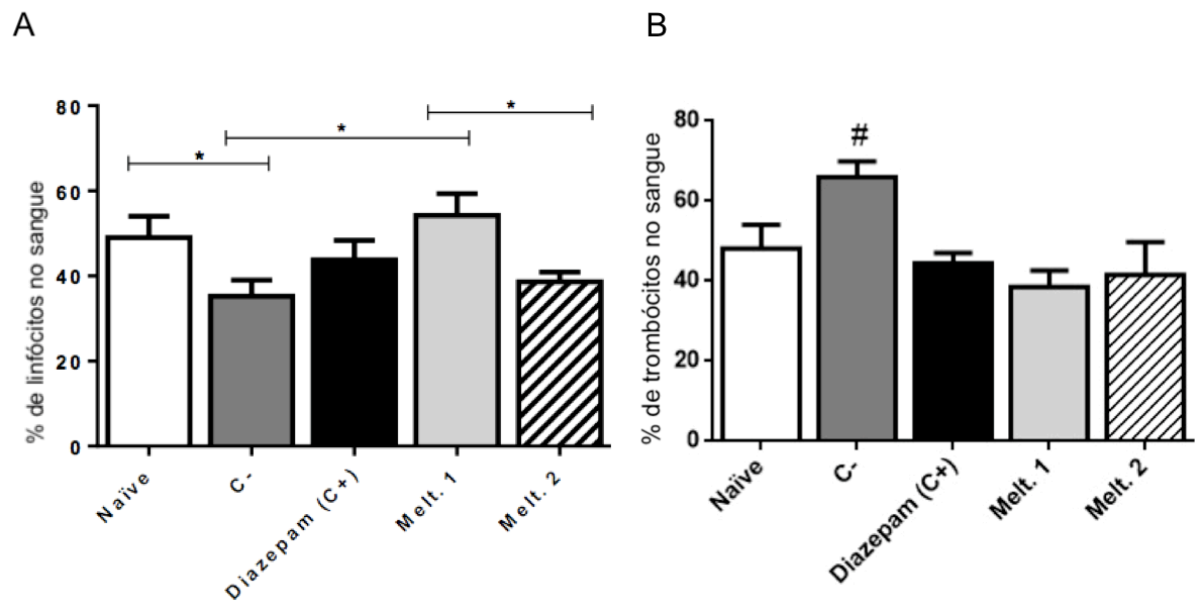


Figura 2

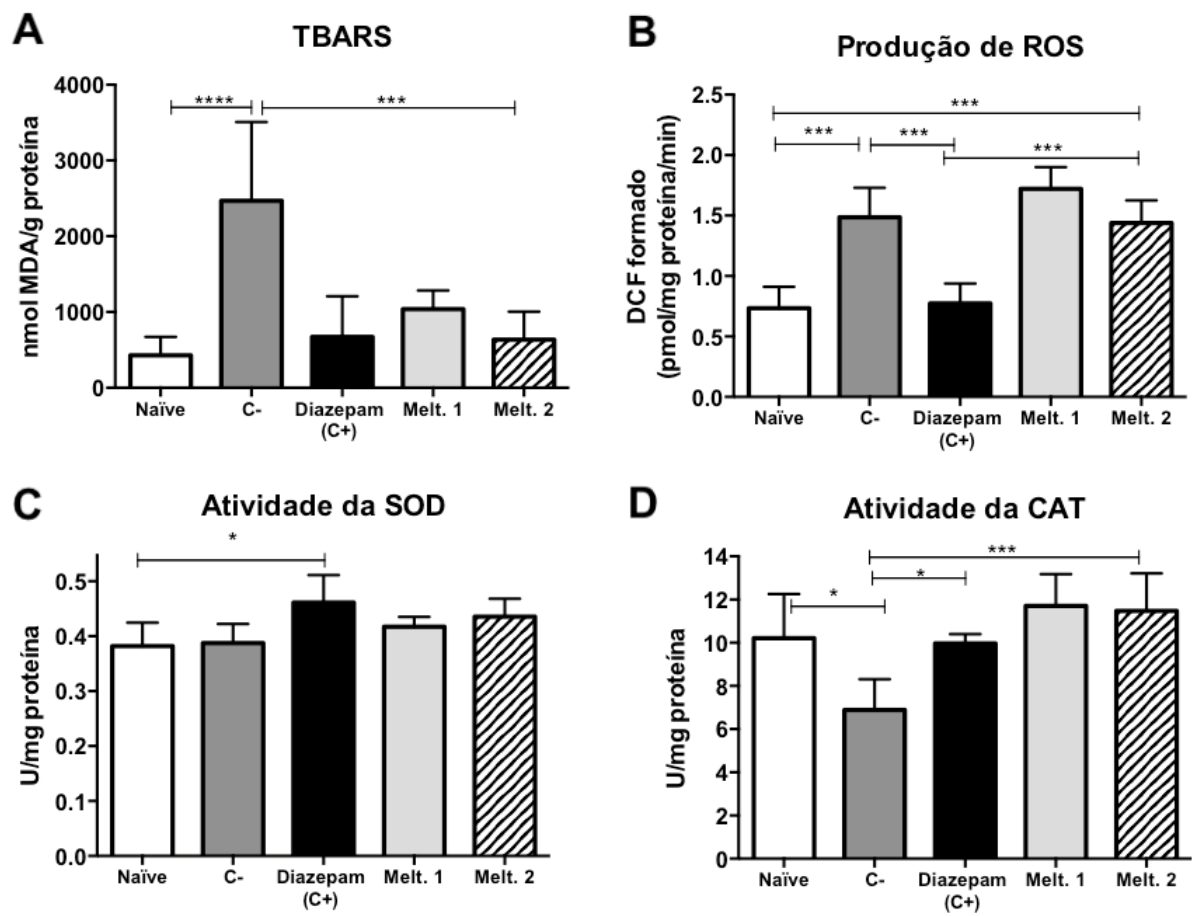


Figura 3

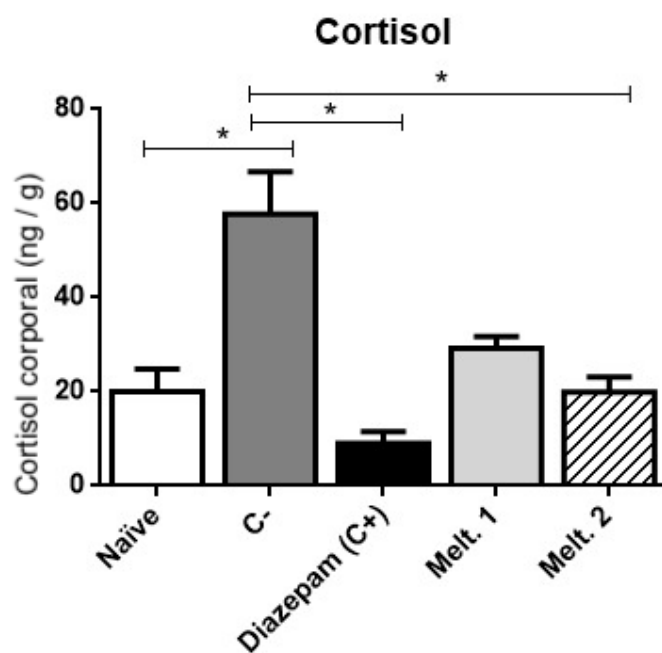


Figura 4

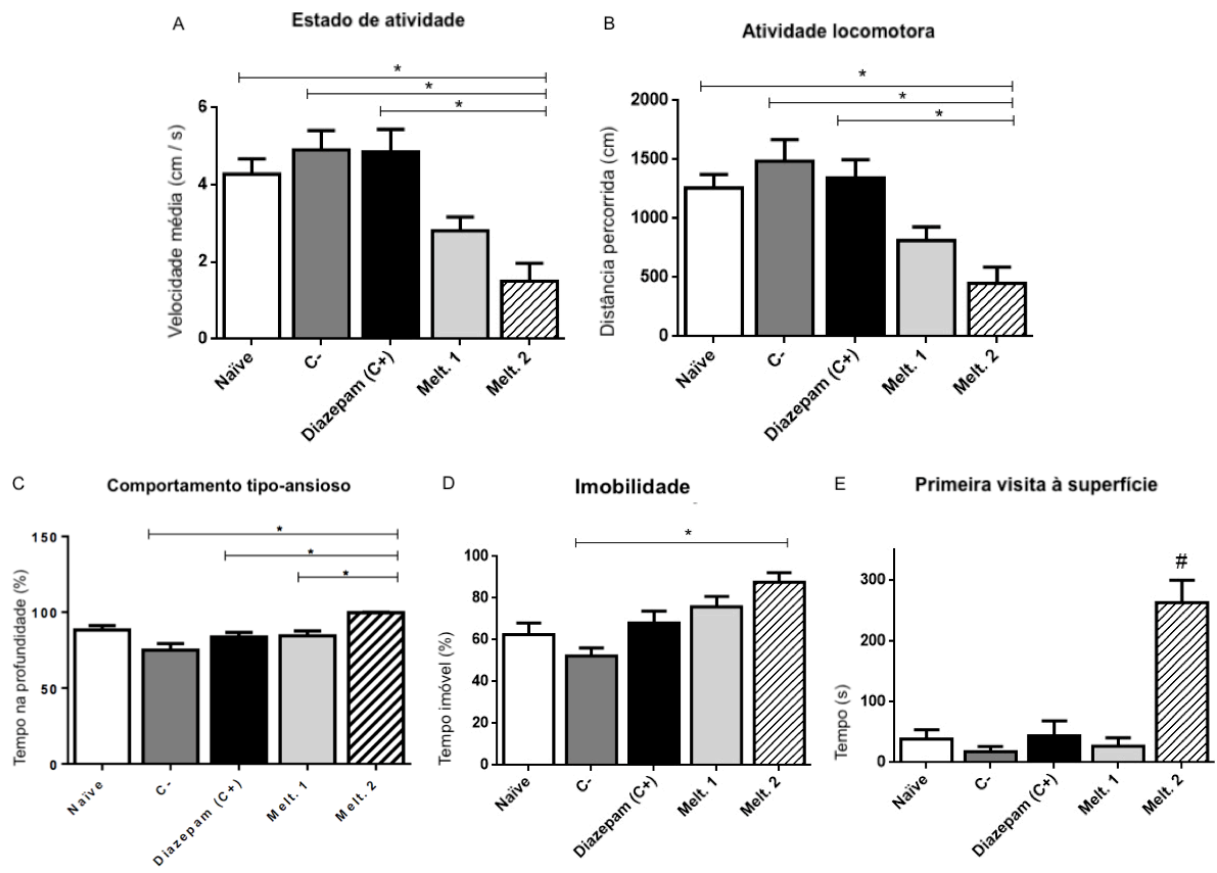


Figura 5

**ARTIGO 2 – EXPOSIÇÃO CRÔNICA À MELATONINA E AO DIAZEPAM EM
ZEBRAFISH (*Danio rerio*) SUBMETIDOS AO ESTRESSE**

Artigo segue as normas do periódico *Fish Physiology and Biochemistry*, ao qual será submetido.

Exposição crônica à melatonina e ao diazepam em zebrafish (*Danio rerio*) submetidos ao estresse

Luciana Crepaldi Lunkes^a,
Isadora Marques Paiva^b,
Renata Catão Egger^a,
Wesley Fernandes Braga^c,
Jaqueline Isaura Alvarez-Leite^c,
André Rodrigues da Cunha Barreto-Vianna^a,
Luis David Solis Murgas^{a*}

^aUniversidade Federal de Lavras, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Departamento de Medicina Veterinária, Lavras, MG, Brasil

^bUniversidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós Graduação em Genética, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, MG, Brasil

Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^cUniversidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Imunologia, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Belo Horizonte, MG, Brasil

*Autor correspondente: Luis David Solis Murgas

Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Brasil

Campus Universitário, Caixa postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil

E-mail: lsmurgas@dmv.ufla.br

Telefone: +553538291728

Conflito de interesse: Os autores declaram não haver nenhum conflito de interesse.

Agradecimentos: Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e recebeu apoio da Rede Mineira de Bioterismo e da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

Resumo

Este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da exposição crônica à melatonina e ao diazepam em *zebrafish* (*Danio rerio*) submetidos ao estresse. 120 *wild-type* foram divididos em cinco diferentes grupos: controle Naïve (N), controle negativo com animais submetidos a um protocolo de estresse crônico (C-), animais expostos cronicamente ao diazepam (C+) e a duas concentrações de melatonina (Melt. 1 com 6800 nM e Melt. 2 com 13600 nM). O protocolo de estresse crônico foi baseado na condução de diferentes fontes estressoras em diferentes horários durante oito dias. Foram contabilizadas as células de defesa sanguínea, quantificada a atividade enzimática e mensurados os níveis de cortisol corporal. Todos os animais foram submetidos ao teste de campo aberto, analisado através do *software* EthoVision XT® (Noldus). Ocorreu trombocitose significativa no grupo de animais estressados, com trombocitopenia naqueles tratados com diazepam. A extensão da peroxidação lipídica (TBARS) foi evidenciada de forma significativa no grupo estressado, e tanto o diazepam quanto a melatonina nas duas concentrações testadas favoreceram a redução do estresse oxidativo. Em relação a enzima superóxido dismutase (SOD), os animais tratados com diazepam apresentaram sua atividade aumentada em relação aos grupos N e C-. Na atividade da catalase (CAT) não houveram alterações significativas. Não houveram variações nos níveis de cortisol corporal entre os grupos. Os animais expostos à melatonina apresentaram uma média de atividade natatória significativamente superior ao grupo controle e aos animais expostos ao diazepam, e aqueles tratados com a concentração menor apresentaram imobilidade significativamente inferior em relação ao grupo controle N e C+, portanto, a melatonina não induziu estado de sono nesses animais.

Palavras-chave: Peixe. Indolamina. Locomoção. Ansiolítico. Estresse oxidativo.

Introdução

O *zebrafish* (*Danio rerio*) é um vertebrado aquático de pequeno porte (3-4cm) amplamente utilizado em pesquisas nas áreas biomédicas e biologia comparativa e evolutiva, caracterizado dentro de uma grande diversidade de espécies e mutações (Parichy 2007). Quando comparado a outros modelos mais comumente utilizados no meio experimental, como a drosófila e o camundongo, apresenta inúmeras vantagens, como seu desenvolvimento embrionário externo e transparente, sua grande capacidade reprodutiva (cerca de 200/fêmea/dia), o tempo para atingir a idade adulta (60-90 dias) e seu baixo custo de manutenção diária. Outro fator inclui a

possibilidade da sua utilização como modelo para testes pré-clínicos dos mais diversos compostos em diversos animais simultaneamente expostos diretamente na água (Kalueff et al. 2014; Siebel et al. 2015). Neste contexto, o repertório comportamental do *zebrafish* tem sido muito utilizado em diversos campos específicos de pesquisa auxiliando na compreensão de muitos fenômenos, como ansiedade e respostas ao estresse (Stewart et al. 2011; Dametto et al. 2018).

O estresse é uma condição induzida por um fator que gera uma resposta endócrina que pode ser benéfica ou desvantajosa (Gorissen and Flik 2016). Os estressores podem variar de muito breves até prolongados ou permanentes, no entanto, os conceitos “agudo” e “crônico” referem-se muito mais à duração das consequências sobre a fisiologia do animal (Boonstra 2013). Normalmente, o estresse crônico associa-se a condições que trazem prejuízos ao animal, podendo causar um estado de anorexia, alterações nos padrões locomotores e aumentos nos níveis de cortisol no plasma e nos níveis de serotonina no cérebro (Sorensen et al. 2011, 2012). Se a resposta endócrina não resultar em uma recuperação oportuna, a regulação homeostática permanece perturbada, o sistema imune é suprimido e patologias poderão surgir (Nardocci et al. 2014; Gorissen and Flik 2016).

Por tratar-se de uma situação de desequilíbrio homeostático, e principalmente por gerar consequências muitas vezes irreversíveis, busca-se cada vez mais mecanismos capazes de prevenir as circunstâncias associadas ao estresse (Rambo et al. 2017; Marcon et al. 2018). Associado a isso, a melatonina, um hormônio produzido pela glândula pineal conhecido como um importante regulador do ritmo biológico, tem se destacado por outros diversos efeitos, apesar de ainda não estarem totalmente esclarecidos na literatura (Falcón et al. 2010; Esteban et al. 2013; Feng and Bass 2014; Lima-Cabello et al. 2014; Vielma et al. 2014; Wai et al. 2014; Maitra and Hasan 2016; DIAS et al. 2017).

Por outro lado, a ansiedade representa uma resposta a ameaças futuras ou possíveis, geralmente manifestadas em comportamentos associados a evitação (Craske et al. 2009) e padrões de natação em direção ao fundo (Levin et al. 2007). Nesse sentido, os benzodiazepínicos como o diazepam são conhecidos por causar um efeito promotor de sono (sedação), e isso ocorre pela ativação dos receptores GABA (Zhdanova et al. 2001; Savić et al. 2006). Seu uso prolongado aumenta o risco de abuso e dependência (Janhsen et al. 2015).

Diante da necessidade de novos estudos envolvendo modelos de estresse e ansiedade, associando o esclarecimento dos possíveis mecanismos de ação hormonal, este estudo foi executado com o objetivo de verificar os possíveis efeitos da exposição crônica à melatonina e ao diazepam em *zebrafish* (*Danio rerio*) submetidos ao estresse crônico.

Material e métodos

Animais

Foram utilizados neste estudo 120 zebrafish *wild-type* adultos de ambos os sexos ($0,305 \pm 0,11$ g). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em aquários de 20-L e aclimatados durante dez dias (2 animais por litro). Foram mantidas as condições experimentais caracterizadas pela manutenção da temperatura por termostatos a $26^{\circ}\text{C} \pm 2$, bombas de oxigenação individuais e monitoramento diário dos parâmetros de qualidade da água (pH 7,0, oxigênio dissolvido $7,5 \text{ mgO}_2/\text{L}$, amônia ideal = 0). Durante o período experimental, os animais foram alimentados duas vezes ao dia com ração floculada nutricionalmente adequada para a espécie (Alcon BASIC®, Alcon, Brasil) e mantidos em fotoperíodo de 14h luz/10h escuro. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos mediante aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (001/2018, CEUA-Unilavras).

Protocolo de estresse

O protocolo de estresse crônico foi desenvolvido com base em estudos anteriores (Zimmermann et al. 2016; Fulcher et al. 2017) e está resumido na tabela 1.

Tabela 1 Protocolo de estresse crônico desenvolvido ao longo de oito dias (D1-D8) utilizando diferentes estressores em diferentes horários

Dias	Horário	Estresse
D1	10:00	Substituir $\frac{3}{4}$ da água 3 vezes consecutivas
	15:00	Aumentar a temperatura para 33°C durante 30 minutos
D2	11:00	Exposição ao ar por 1 minuto
	17:00	Diminuir a temperatura para 23°C durante 30 minutos
D3	11:30	Colocar os animais em um béquer com 600 mL por 50 minutos
	14:30	Exposição ao predador (<i>Astronotus ocellatus</i>) por 50 minutos
D4	10:00	Exposição do dorso por 2 minutos e reposição da água
	16:00	Mudança de tanque 3 vezes consecutivas
D5	09:00	Diminuir a temperatura para 23°C durante 30 minutos
	15:00	Colocar os animais em um béquer com 600 mL por 50 minutos
D6	12:00	Mudança de tanque 3 vezes consecutivas
	18:30	Perseguição com a rede por 8 minutos
D7	09:30	Aumentar a temperatura para 33°C durante 30 minutos
	13:00	Exposição ao ar por 1 minuto
D8	10:30	Colocar os animais em um béquer com 600 mL por 50 minutos
	17:30	Exposição do dorso por 2 minutos e reposição da água

Fonte: Protocolo desenvolvido pelo autor, baseado em Zimmermann et al. 2016 e Fulcher et al. 2017.

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos:

- Grupo naïve (N): não submetidos ao estresse nem expostos a qualquer tipo de composto;
- Grupo controle negativo (C-): apenas submetidos ao estresse;
- Grupo controle positivo (C+): submetidos ao estresse e tratados com diazepam;
- Grupo concentração 1 (Melt. 1): submetidos ao estresse e tratados com baixa dose de melatonina (6800 nM);
- Grupo concentração 2 (Melt. 2): submetidos ao estresse e tratados com alta dose de melatonina. (13600 nM).

Exposição à melatonina (Melt. 1; Melt. 2) e ao diazepam (C+)

O protocolo de exposição foi repetido ao longo dos oito dias, às 8:30h, e consistiu na exposição a 0,16 mg/mL de diazepam durante 10 minutos (Gebauer et al. 2011; De Abreu et al. 2014) e a duas diferentes concentrações de melatonina (6800 nM e 13600 nM) durante 20 minutos.

No momento da exposição ao diazepam e à melatonina, todos os animais eram transportados para um aquário de destino, evitando possíveis interferências de resíduos acumulados na água. Ao final do protocolo, os mesmos eram transferidos de volta para seus aquários de estoque. Todos os animais em tratamento foram submetidos aos mesmos procedimentos de transporte a fim de evitar quaisquer interferências nos resultados provindas de fatores externos. Diariamente, após a exposição, os animais foram submetidos ao protocolo de estresse crônico. Os protocolos de coleta foram realizados no nono dia, associadas ao perfil hematológico e à atividade enzimática, aos níveis de cortisol corporal e às variáveis comportamentais.

Coleta e análises de sangue e da atividade enzimática

Após os oito dias de estresse crônico, para analisar o perfil hematológico, os animais (n = 8 por grupo) foram eutanasiados por imersão em água gelada (0-4°C) até sua completa imobilização (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal 2015). Em seguida, foi realizada uma secção transversal entre as nadadeiras caudal e anal, e, com um tubo capilar heparinizado, foi coletado o sangue que vertia dessa incisão, utilizado para confecção de lâminas de extensão sanguínea (Pedroso et al. 2012). Foram contabilizadas de forma diferencial as células sanguíneas de defesa orgânica (trombócitos e leucócitos) (Grzelak et al. 2017).

O perfil enzimático associado ao estresse oxidativo foi analisado através da atividade das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e das enzimas superóxido dismutase

(SOD) e catalase (CAT) no corpo inteiro de 40 animais (8 em cada grupo). Os animais foram macerados em nitrogênio líquido e as amostras foram pesadas e homogeneizadas em solução tampão-fosfato 50mM (pH = 7,2). O homogenato foi centrifugado (10500g, 4°C, 10 minutos) para obtenção do sobrenadante para dosagem de TBARS e determinação das atividades de SOD e CAT.

A peroxidação lipídica foi determinada pela formação de TBARS, identificada pelo malonaldeído (MDA), formado a partir da degradação de ácidos graxos poliinsaturados (Buege and Aust 1978). O resultado foi expresso em nmol de MDA/g de proteína, normalizado pela concentração de proteínas dos tecidos, utilizando a albumina como padrão (Lowry et al. 1951).

A dosagem da atividade da superóxido dismutase (SOD) baseou--se na sua habilidade em catalisar a dismutação de radicais superóxidos (O_2^-), à H_2O_2 e O_2 , diminuindo a razão de auto-oxidação do pirogalol, portanto, seu resultado foi expresso em Unidades por mg de proteína (U/mg proteínas) (Dieterich et al. 2000).

A dosagem da atividade da CAT baseou-se no decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) – (A_{240}) pela decomposição deste pela catalase ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$), assim, seu resultado foi expresso por concentração de proteína (Atividade/mg de proteína) (Aebi 1984).

Extração e mensuração do cortisol corporal

Oito animais de cada grupo foram mantidos congelados após o estresse crônico, posteriormente submetidos aos procedimentos de extração e análise. Para a extração do cortisol, as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido, diluídas em solução fosfato-salino (PBS), dissolvidas em éter dietílico, centrifugadas por 5 minutos a 10500g e evaporadas por aspersão em nitrogênio (Canavello et al. 2011). A alíquota foi ressuspensa em PBS e o cortisol foi mensurado em duplicada pelo kit ELISA (Cortisol ELISA kit – USA Diagnóstica) validado para peixes (Velasco-Santamaría and Cruz-Casallas 2007), seguido pelo procedimento de leitura (Leitor de ELISA Biotek®).

Variáveis comportamentais

Os parâmetros comportamentais associados ao estado de atividade (média de velocidade), atividade locomotora (distância percorrida), comportamento tipo-ansioso (permanência na profundidade do aquário), estado de mobilidade (tempo imóvel) e primeira visita à superfície do aquário foram avaliados individualmente em oito animais de cada grupo.

O *software* EthoVision XT® (Noldus) foi utilizado para quantificar a atividade natatória dos peixes durante 300 segundos de vídeo (teste de campo aberto) (Siebel et al. 2015) seguintes aos primeiros 60 segundos de gravação, que foram desconsiderados. As imagens foram feitas por câmeras semiprofissionais, com ajustes precisos de distância e foco para cada aquário, sem qualquer possibilidade de interferência externa durante o tempo de gravação.

Análises estatísticas

O teste de Shapiro-wilk foi utilizado para testar a normalidade dos dados, seguidos por ANOVA e pós-teste com múltiplas comparações de Tukey para dados paramétricos e teste de Kruskal-wallis seguido do pós teste de Dunn's para dados não paramétricos. Todas as análises foram conduzidas com auxílio do programa GraphPad Prism 7.01. Diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

Resultados

Perfil hematológico e estresse oxidativo

A contagem das células de defesa sanguínea está representada na figura 1 através de linfócitos (Figura 1A) e trombócitos (Figura 1B). O grupo de animais tratados com diazepam apresentou um perfil semelhante ao grupo controle (N), assim como a melatonina na maior concentração (13600 nM). No grupo de animais submetidos ao estresse crônico (C-), ocorreu trombocitose significativa ($p = 0,0383$) em comparação ao controle (N).

Os animais tratados com diazepam apresentaram trombocitopenia significativa ($p = 0,014$), aproximando o perfil hematológico do grupo controle N. A menor concentração de melatonina (6800 nM) não foi capaz de conter a trombocitose possivelmente promovida pela condição crônica de estresse. Já os animais tratados com a maior concentração de melatonina (13600 nM) apresentaram um perfil semelhante ao grupo controle N e aos animais expostos ao diazepam.

Na Figura 2 observa-se os resultados do perfil enzimático associado ao estresse oxidativo com base na formação de TBARS (Figura 2A) e atividade das enzimas SOD (Figura 2B) e CAT (Figura 2C). A extensão da peroxidação lipídica foi evidenciada de forma significativa ($p = 0,0011$) no grupo de animais submetidos ao estresse crônico (C-) em comparação ao controle (N). O diazepam foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,0002$) a formação dessas substâncias reativas, aproximando os valores do grupo controle (N). A melatonina nas duas concentrações testadas também favoreceu a redução do estresse oxidativo de forma

significativa ($p = 0,0008$). Em relação a SOD, os animais tratados com diazepam apresentaram sua atividade aumentada em relação aos grupos controle Naïve (N) ($p = 0,0481$) e submetidos ao estresse crônico (C-) ($p = 0,0465$). Na atividade da CAT não houveram alterações significativas.

Níveis de cortisol corporal

Para os níveis de cortisol corporal, como demonstrado pela Figura 3, houve uma tendência de aumento no grupo de animais submetidos ao estresse (C-) quando comparados ao controle (N), no entanto, nenhuma variação foi estatisticamente significativa.

Comportamento

A Figura 4 demonstra os resultados encontrados a nível comportamental para o estado de atividade (Figura 4A), atividade locomotora (Figura 4B), comportamento tipo-ansioso (Figura 4C) e estado de mobilidade (Figura 4D). As médias de velocidade e distância percorrida foram semelhantes entre os grupos controle (N), animais submetidos ao estresse crônico e expostos ao diazepam. Os animais expostos à melatonina nas duas concentrações apresentaram uma média de atividade natatória significativamente ($p = 0,0064$; $p = 0,277$) superior ao grupo controle N e aos animais expostos ao diazepam ($p = 0,0044$; $p = 0,0198$).

Para o comportamento tipo-ansioso, não houveram diferenças significativas entre os grupos. Os animais tratados com melatonina na concentração menor apresentaram imobilidade significativamente inferior em relação ao grupo controle N ($p = 0,0238$) e C+ ($p = 0,0287$), portanto, a melatonina não induziu estado de sono nesses animais.

Discussão

Os resultados evidenciaram que o estresse promove alterações no perfil hematológico (trombocitose) e no aumento da peroxidação lipídica evidenciado pelas TBARS. A exposição crônica ao diazepam refletiu em trombocitopenia, redução do estresse oxidativo e aumento de atividade da SOD. A melatonina também favoreceu a redução do estresse oxidativo e não induziu estado de sono nos animais.

O perfil hematológico no estresse crônico (cinco dias, duas vezes ao dia) foi descrito em *zebrafish* por Grzelak et al. (2017), onde essa condição induziu linfopenia e monocitose mas não promoveu alterações significativas em relação aos neutrófilos. A tendência à linfopenia foi evidenciada nos animais neste estudo, no entanto, essa variação não foi significativa. Como o protocolo deste estudo continha três dias a mais, é possível que os animais tenham

desencadeado um efeito de acomodação, já que a linfopenia é resultante da liberação imediata dessas células na corrente sanguínea e nos tecidos. A exposição crônica a glicocorticoides como o cortisol podem induzir a apoptose de células linfoides, podendo levar à linfotoxicidade, hipoplasia linfoide e diminuição da linfopoiese (Schwartzman and Cidlowski 1994; Weyts et al. 1998; Verburg-Van Kemenade et al. 1999). Como não houveram variações significativas nos níveis de cortisol, essa é uma hipótese para que a linfopenia também não tenha sido significativa.

Uma exposição crônica ao diazepam dose-dependente sugere alterações mais significativas no perfil hematológico de peixes, aumentando o número de linfócitos apenas no início, mas não promovendo alterações significativas tardiamente (Ogueji et al. 2017). Os grupos tratados com melatonina mantiveram perfil semelhante ao grupo controle N e ao diazepam, ou seja, apresentaram um perfil pré-inflamatório. Essa tendência corrobora com os achados da literatura de que esse hormônio pode estimular a proliferação de linfócitos (Esteban et al. 2013). A trombocitose significativa no grupo de animais cronicamente estressados foi importante para a validação do modelo utilizado neste estudo, já que era um resultado esperado em uma condição de estresse (Wedemeyer et al. 1984; Dick and Dixon 1985; Ruparelia et al. 1990), bem como a trombocitopenia nos animais tratados com diazepam.

Quando as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico estão aumentadas, traduzem a extensão da peroxidação lipídica possivelmente resultante do estresse oxidativo, que ocorre toda vez que os sistemas de defesa antioxidante não são capazes de controlar as espécies reativas ao oxigênio (ROS) (Sies 1985; Martínez-Cayuela 1995; Agarwal et al. 2003; Bartoskova et al. 2013). Isso foi observado nos animais estressados cronicamente em comparação ao grupo controle, contribuindo para a validação desse protocolo de estresse crônico em *zebrafish*.

A exposição crônica ao diazepam e à melatonina foi capaz de promover um efeito atenuante e possivelmente antioxidante associado ao estresse, considerando que os níveis de TBARS foram significativamente menores em relação ao grupo C-. Outros autores tem estudado as vias de atuação da melatonina no estresse oxidativo, sugerindo que esse hormônio pode atuar indiretamente, estimulando a atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, entre outras), ou diretamente, inibindo as espécies reativas de oxigênio (Bonfont-Rousselot and Collin 2010). No entanto, diversas outras vias de atuação podem estar vinculadas aos efeitos antioxidantes que auxiliam na prevenção de danos celulares, o que envolve enzimas e moléculas (Bartoskova et al. 2013).

No grupo C+ a atividade da SOD foi significativamente aumentada em relação aos grupos N e C-. A SOD catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio,

caracterizando uma importante defesa antioxidante. Seu aumento contribui para a eliminação de espécies reativas de oxigênio através de processos de dismutação, decomposição e desintoxicação (Zhang et al. 2004; Bartoskova et al. 2013), podendo, portanto, auxiliar em uma condição de estresse (Wang et al. 2011). Como os valores de SOD e CAT não apresentaram variações significativas dos grupos tratados com melatonina em relação aos outros grupos (N, C- e C+), apesar da caracterização de um perfil de enfrentamento ao estresse oxidativo, não é possível afirmar que essa exposição crônica promova efeitos antioxidantes, e isso pode estar associado aos diferentes estímulos para ativação dessas enzimas em uma condição estressante tempo-dependente.

Apesar do cortisol ser amplamente aceito como um bom indicador de estresse em peixes (Gesto et al. 2015), sabe-se que seu aumento é rápido e expressivo em condições de estresse agudo (Ramsay et al. 2009; Fulcher et al. 2017; Cortés et al. 2018). Grande parte do cortisol no sangue circula ligado à proteínas transportadoras, podendo interagir com diversos hormônios (Mommsen et al. 1999). Em peixes, existe um *feedback* que controla a liberação do cortisol, onde altos níveis circulantes desse hormônio promovem uma retroalimentação negativa na produção e liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que estimula a síntese do cortisol, pela hipófise. O cortisol também pode apresentar *feedback* sobre o hipotálamo e influenciar a liberação dos hormônios liberadores de corticotrofinas (CRFs) (Lima et al. 2006; Øverli et al. 2007; Oba et al. 2009).

Inicialmente, os animais podem ter apresentado um aumento nos níveis de cortisol, como ocorre em animais com as mesmas características submetidos a uma situação de estresse agudo (Lunkes et al., dados não publicados). Porém, durante a exposição prolongada, assumiram uma condição de acomodação. De acordo com Wendelaar Bonga (1997), quando o estressor é crônico, as concentrações de cortisol podem permanecer elevadas, mas normalmente ficam abaixo dos níveis máximos. Pesquisas anteriores demonstraram algumas fontes estressoras crônicas em diferentes intervalos de tempo que também não modificaram os níveis de cortisol (Manuel et al. 2014; Pavlidis et al. 2015) ou até mesmo reduziram (Shams et al. 2017).

Além disso, a ausência de níveis elevados de cortisol não necessariamente está relacionada à ausência do estresse, o que comumente acontece no estresse crônico, com níveis mais baixos dificilmente diferenciados do repouso, porém, podendo gerar sérias implicações na depressão do sistema imunológico e na resistência a doenças (Wendelaar Bonga 1997; Mommsen et al. 1999; Lima et al. 2006). É importante destacar que o perfil de cortisol circulante pode variar em concentrações basais médias de acordo com a divergência na especificidade dos métodos

de análise, pelas diferentes condições de criação dos peixes, por procedimentos de captura e mesmo por fatores naturais e biológicos (Barton and Iwama 1991).

Observa-se nos resultados encontrados para as variáveis comportamentais associadas ao estado de atividade do animal (média de velocidade em cm/s) e a atividade locomotora (distância percorrida em cm) um perfil semelhante entre os animais do grupo controle (N), submetidos ao estresse crônico (C-) e tratados com diazepam (C+). Em condições de estresse agudo, o aumento do cortisol faz com que a atividade locomotora do animal aumente, principalmente durante a primeira hora (Øverli et al. 2002). Após 48 horas, diante de uma situação de estresse já considerada crônica, a locomoção e a agressividade normalmente diminuem.

Como os valores de cortisol não diferiram de forma significativa entre os grupos, é possível que a atividade natatória tenha sido pouco influenciada pelo estresse crônico, sugerindo uma condição de adaptação. Apesar dos valores das médias serem superiores no grupo estressado, enquanto os grupos N e C+ mantiveram padrões semelhantes, a diferença não foi estatisticamente significativa. Para peixes, especificamente em *zebrafish*, sempre que o animal assume uma condição exploratória de um ambiente até então desconhecido, seu comportamento inicial associa-se à fuga, seguido por uma exploração mais vertical associada a uma maior quantidade de movimentos erráticos e *freezing*, que são caracterizados por episódios de congelamento do animal (Kysil et al. 2017).

Durante a filmagem, todos os animais foram individualmente alocados em aquários individuais com as mesmas condições experimentais. Apesar das especificações do teste de campo aberto não sugerirem um tempo padrão (Siebel et al. 2015), o primeiro minuto de filmagem foi descartado da análise, objetivando desconsiderar esse período de adaptação. Ainda assim, esse comportamento exploratório dos animais do grupo controle pode ter sido evidenciado, dadas as médias de deslocamento e velocidade. Testes amplamente utilizados em *zebrafish*, como o teste de mergulho em um novo tanque, sugerem até 6 minutos de exploração do animal nesse novo ambiente (Cachat et al. 2011). Os animais expostos à melatonina apresentaram, de forma significativa, maiores médias de velocidade e distância percorrida quando comparados ao grupo controle (N). Como a exposição à melatonina era feita diariamente, é possível que tenha sido caracterizada como um fator estressante a mais, já que estressores químicos podem provocar respostas inespecíficas em peixes (Barton 2002). Naturalmente, a reação do animal depende do tipo de estressor, sua intensidade e eventual repetição (Korte et al. 2007; Schreck 2010).

Para os animais expostos ao diazepam, é possível que sua ação sedativa tenha controlado esse efeito estressor adicional. Para o comportamento tipo-ansioso, todos os animais demonstraram preferência pela profundidade do aquário. Em *zebrafish*, a mensuração da preferência pela superfície ou profundidade no tanque é uma medida útil de ansiedade (Levin et al. 2007), e tratamentos com exposição aguda à nicotina aguda (Levin et al. 2007), buspirona (Bencan et al. 2009) e exposição crônica à fluoxetina (Egan et al. 2009) promovem efeitos ansiolíticos, reduzindo a permanência do animal na profundidade do aquário. No entanto, alguns benzodiazepínicos como diazepam e clordiazepóxido podem apresentar resultados inconsistentes (Bencan et al. 2009), ainda que existam trabalhos apontando seus efeitos (Gebauer et al. 2011; De Abreu et al. 2014).

Considerando as médias de imobilidade, a melatonina não foi capaz de promover um estado de sono nos animais expostos de forma crônica ao longo de dois oitenta dias, pois os animais tratados nas concentrações menor permaneceram imóveis durante um tempo significativamente inferior em relação ao grupo controle N e aos animais tratados com diazepam. Existe uma ampla distribuição de receptores dentro de um conjunto de atividades rítmicas associadas à melatonina, traduzindo múltiplos efeitos na regulação neuroendócrina (Falcón et al. 2007, 2011). Como nos mamíferos, em peixes a melatonina pode ser produzida em tecidos extrapineais além da retina (Venegas et al. 2012; Acuña-Castroviejo et al. 2014), e nesses tecidos os receptores podem variar amplamente. Portanto, uma exposição crônica poderia estimular diferentes vias em diversos momentos, podendo modificar, inclusive, a sensibilidade dos receptores em relação ao hormônio melatonina.

A fisiologia do estresse em peixes e os paradigmas que descrevem a forma como esses animais respondem a esses eventos vem, cada vez mais, sendo pesquisados e compreendidos. No entanto, ainda existem inúmeras incógnitas a serem solucionadas para que nosso entendimento seja mais abrangente. Apesar de termos condições relativamente de qualidade para perceber quando um animal está estressado, como os níveis hormonais acima das concentrações basais, ainda há pouca evidência para prever quando os peixes se recuperaram da exposição a estressores, principalmente os crônicos. Portanto, concentrações circulantes de hormônios ou outros fatores, até mesmo comportamentais, não significam necessariamente que o peixe tenha se recuperado completamente. Por isso, é tão importante que sejam desenvolvidos estudos que correlacionem as mais diversas variáveis, já que nem sempre indicativos comportamentais são comprovados a nível bioquímico.

Conclusão

Os resultados permitem concluir que o *zebrafish* é um modelo possivelmente utilizado na condução de estudos associados ao estresse. O protocolo de estresse crônico gerou alterações no perfil hematológico associado a trombocitose e no aumento dos níveis de TBARS, refletindo na peroxidação lipídica. A exposição crônica ao diazepam promoveu efeitos em animais estressados associados ao perfil hematológico (trombocitopenia) e à redução dos níveis de TBARS. A exposição crônica à melatonina nas concentrações de 6800 e 13600 nM reduziu os níveis de TBARS e promoveu aumento no estado de atividade locomotora, sugerindo que a exposição crônica à melatonina não promove efeitos significativos na prevenção do estresse.

Referências

- Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, et al (2014) Extrapineal melatonin: Sources, regulation, and potential functions. *Cellular and Molecular Life Sciences* 71:2997–3025. doi: 10.1007/s00018-014-1579-2
- Aebi H (1984) Catalase in Vitro. *Methods in Enzymology*. doi: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA (2003) Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and sterility* 79:829–43.
- Barton BA (2002) Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* 42:517–525. doi: 10.1093/icb/42.3.517
- Barton BA, Iwama GK (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases* 1:3–26. doi: 10.1016/0959-8030(91)90019-G
- Bartoskova M, Dobsikova R, Stancova V, et al (2013) Evaluation of ibuprofen toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of oxidative stress. *Neuroendocrinology Letters* 34:102–108.
- Bencan Z, Sledge D, Levin ED (2009) Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 94:75–80. doi: 10.1016/j.pbb.2009.07.009
- Bonnefont-Rousselot D, Collin F (2010) Melatonin: Action as antioxidant and potential

- applications in human disease and aging. *Toxicology* 278:55–67. doi: 10.1016/j.tox.2010.04.008
- Boonstra R (2013) Reality as the leading cause of stress: rethinking the impact of chronic stress in nature. *Functional Ecology* 27:11–23. doi: 10.1111/1365-2435.12008
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology* 52:302–10.
- Cachat JM, Canavello PR, Elkhayat SI, et al (2011) Video-Aided Analysis of Zebrafish Locomotion and Anxiety-Related Behavioral Responses. pp 1–14
- Canavello PR, Cachat JM, Beeson EC, et al (2011) Neuromethods: Preface. *Neuromethods* 51:135–142. doi: 10.1007/978-1-60761-953-6
- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (2015) DIRETRIZ DA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA. pp 1–54
- Cortés R, Teles M, Oliveira M, Cerdá-reverter JM (2018) Effects of acute handling stress on short-term central expression of orexigenic / anorexigenic genes in zebrafish. *Fish Physiology and Biochemistry* 44:257–272.
- Craske MG, Rauch SL, Ursano R, et al (2009) What is an anxiety disorder? *Depression and Anxiety* 26:1066–1085. doi: 10.1002/da.20633
- Dametto FS, Fior D, Idalencio R, et al (2018) Feeding regimen modulates zebrafish behavior. *PeerJ* 6:1–17. doi: 10.7717/peerj.5343
- De Abreu MS, Koakoski G, Ferreira D, et al (2014) Diazepam and fluoxetine decrease the stress response in zebrafish. *PLoS ONE* 9:1–5. doi: 10.1371/journal.pone.0103232
- DIAS CAG de M, FECURY AA, OLIVEIRA E de, et al (2017) Melatonina e Peixes : Uma Revisão.
- Dick PT, Dixon DG (1985) Changes in circulating blood cell levels of rainbow trout , *Sulmo gairdneri* Richardson , following acute and chronic exposure to copper. *Journal of Fish Biology* 26:475–481.
- Dieterich S, Bieligk U, Beulich K, et al (2000) Gene Expression of Antioxidative Enzymes in the Human Heart : Increased Expression of Catalase in the End-Stage Failing Heart. *Circulation* 101:33–9. doi: 10.1161/01.CIR.101.1.33
- Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, et al (2009) Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research* 205:38–44. doi: 10.1016/j.bbr.2009.06.022
- Esteban MÁ, Cuesta A, Chaves-Pozo E, Meseguer J (2013) Influence of melatonin on the immune system of fish: A review. *International Journal of Molecular Sciences* 14:7979–

7999. doi: 10.3390/ijms14047979
- Falcón J, Besseau L, Magnanou E, et al (2011) Melatonin, the time keeper: biosynthesis and effects in fish. *Cybiurn* 35:3–18.
- Falcón J, Besseau L, Sauzet S, Boeuf G (2007) Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 18:81–88. doi: 10.1016/j.tem.2007.01.002
- Falcón J, Migaud H, Muñoz-Cueto JA, Carrillo M (2010) Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 165:469–482. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.04.026
- Feng NY, Bass AH (2014) Melatonin action in a midbrain vocal-acoustic network. *Journal of Experimental Biology* 217:1046–1057. doi: 10.1242/jeb.096669
- Fulcher N, Tran S, Shams S, et al (2017) Neurochemical and Behavioral Responses to Unpredictable Chronic Mild Stress Following Developmental Isolation: The Zebrafish as a Model for Major Depression. *Zebrafish* 14:23–34. doi: 10.1089/zeb.2016.1295
- Gebauer DL, Pagnussat N, Piato ÂL, et al (2011) Effects of anxiolytics in zebrafish: Similarities and differences between benzodiazepines, buspirone and ethanol. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 99:480–486. doi: 10.1016/j.pbb.2011.04.021
- Gesto M, Hernández J, López-Patiño MA, et al (2015) Is gill cortisol concentration a good acute stress indicator in fish? A study in rainbow trout and zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology* 188:65–69. doi: 10.1016/j.cbpa.2015.06.020
- Gorissen M, Flik G (2016) *The Endocrinology of the Stress Response in Fish: An Adaptation-Physiological View*. Elsevier Inc.
- Grzelak AK, Davis DJ, Caraker SM, et al (2017) Stress leukogram induced by acute and chronic stress in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Medicine* 67:263–269.
- Janhsen K, Roser P, Hoffmann K (2015) The Problems of Long-Term Treatment With Benzodiazepines and Related Substances. *Deutsches Aerzteblatt Online* 112:1–7. doi: 10.3238/arztebl.2015.0001
- Kalueff A V., Stewart AM, Gerlai R (2014) Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends in Pharmacological Sciences* 35:63–75. doi: 10.1016/j.tips.2013.12.002
- Korte SM, Olivier B, Koolhaas JM (2007) A new animal welfare concept based on allostasis. *Physiology & Behavior* 92:422–428. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.10.018
- Kysil E V., Meshalkina DA, Frick EE, et al (2017) Comparative Analyses of Zebrafish

- Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests Elana. *Zebrafish* 14:1–12. doi: 10.1089/zeb.2016.1415
- Levin ED, Bencan Z, Cerutti DT (2007) Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiology & Behavior* 90:54–8. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.08.026
- Lima-Cabello E, Díaz-Casado ME, Guerrero JA, et al (2014) A review of the melatonin functions in zebrafish physiology. *Journal of Pineal Research* 57:1–9. doi: 10.1111/jpi.12149
- Lima LC, Ribeiro LP, Leite RC, Melo DC (2006) Stress in fishes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 30:113–117.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. doi: 10.1016/0304-3894(92)87011-4
- Maitra SK, Hasan KN (2016) The Role of melatonin as a hormone and an antioxidant in the control of fish reproduction. *Frontiers in Endocrinology* 7:1–11. doi: 10.3389/fendo.2016.00038
- Manuel R, Gorissen M, Zethof J, et al (2014) Unpredictable chronic stress decreases inhibitory avoidance learning in Tuebingen long-fin zebrafish: stronger effects in the resting phase than in the active phase. *Journal of Experimental Biology* 217:3919–3928. doi: 10.1242/jeb.109736
- Marcon M, Mocelin R, Sachett A, et al (2018) Enriched environment prevents oxidative stress in zebrafish submitted to unpredictable chronic stress. *PeerJ* 6:1–15. doi: 10.7717/peerj.5136
- Martínez-Cayuela M (1995) Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie* 77:147–61.
- Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW (1999) Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9:211–268. doi: 10.1023/A:1008924418720
- Nardocci G, Navarro C, Cortés PP, et al (2014) Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish. *Fish and Shellfish Immunology* 40:531–538. doi: 10.1016/j.fsi.2014.08.001
- Oba ET, Mariano W dos S, Santos LRB dos (2009) Estresse em peixes cultivados: Agravantes e atenuantes para manejo. In: *Manejo e sanidade de peixes em cultivo*. Macapá, pp 226–247
- Ogueji EO, Nwani CD, Iheanacho SC, et al (2017) Hematological alterations in the african catfish (*Clarias gariepinus*) juveniles exposed to sub-chronic concentrations of diazepam.

- Øverli Ø, Kotzian S, Winberg S (2002) Effects of cortisol on aggression and locomotor activity in rainbow trout. *Hormones and behavior* 42:53–61. doi: 10.1006/hbeh.2002.1796
- Øverli Ø, Sørensen C, Pulman KGT, et al (2007) Evolutionary background for stress-coping styles: Relationships between physiological, behavioral, and cognitive traits in non-mammalian vertebrates. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 31:396–412. doi: 10.1016/j.neubiorev.2006.10.006
- Parichy DM (2007) Homology and the evolution of novelty during *Danio* adult pigment pattern development. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 308B:578–590. doi: 10.1002/jez.b.21141
- Pavlidis M, Theodoridi A, Tsalafouta A (2015) Neuroendocrine regulation of the stress response in adult zebrafish, *Danio rerio*. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 60:121–131. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.02.014
- Pedroso GL, Hammes TO, Escobar TDC, et al (2012) Blood Collection for Biochemical Analysis in Adult Zebrafish. *Journal of Visualized Experiments* 63:1–3. doi: 10.3791/3865
- Rambo CL, Mocelin R, Marcon M, et al (2017) Gender differences in aggression and cortisol levels in zebrafish subjected to unpredictable chronic stress. *Physiology and Behavior* 171:50–54. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.12.032
- Ramsay JM, Feist GW, Varga ZM, et al (2009) Whole-body cortisol response of zebrafish to acute net handling stress. *Aquaculture* 297:157–162.
- Ruparelia SG, Verma Y, Saiyed SR, Rawal UM (1990) Effect of Cadmium on Blood of *Tilapia*, *Oreochromis mossambicus* (Peters), During Prolonged Exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 45:305–312.
- Savić MM, Obradović DI, Ugrešić ND, et al (2006) Benzodiazepine site inverse agonists and locomotor activity in rats: Bimodal and biphasic influence. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 84:35–42. doi: 10.1016/j.pbb.2006.04.001
- Schreck CB (2010) Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology* 165:549–556. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.07.004
- Schwartzman RA, Cidlowski JA (1994) Glucocorticoid-induced Apoptosis of Lymphoid Cells. *International Archives of Allergy and Immunology* 105:347–354. doi: 10.1159/000236781
- Shams S, Seguin D, Facciol A, et al (2017) Effect of social isolation on anxiety-related behaviors, cortisol, and monoamines in adult zebrafish. *Behavioral Neuroscience*

- 131:492–504. doi: 10.1037/bne0000220
- Siebel AM, Bonan CD, Silva RS da (2015) Zebrafish como Modelo para Estudos Comportamentais. In: *Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações*. pp 15–55
- Sies H (1985) Oxidative Stress. In: *Oxidative Stress*. Elsevier, pp 1–8
- Sorensen C, Bohlin LC, Overli O, Nilsson GE (2011) Cortisol reduces cell proliferation in the telencephalon of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Physiology & Behavior* 102:518–523. doi: 10.1016/j.physbeh.2010.12.023
- Sorensen C, Nilsson GE, Summers CH, Overli O (2012) Social stress reduces forebrain cell proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Behavioural Brain Research* 227:311–318. doi: 10.1016/j.bbr.2011.01.041
- Stewart A, Maximino C, De Brito TM, et al (2011) Neurophenotyping of adult zebrafish using the light/dark box paradigm. *Neuromethods* 51:157–167. doi: 10.1007/978-1-60761-953-6_13
- Velasco-Santamaría Y, Cruz-Casallas P (2007) Methodology for Determination of Plasma Cortisol in Fish Using Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa). *MVZ Cordoba* 12:869–877.
- Venegas C, García JA, Escames G, et al (2012) Extrpineal melatonin: Analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *Journal of Pineal Research* 52:217–227. doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00931.x
- Verburg-Van Kemenade BML, Nowak B, Engelsma MY, Weyts FAA (1999) Differential effects of cortisol on apoptosis and proliferation of carp B-lymphocytes from head kidney, spleen and blood. *Fish & Shellfish Immunology* 9:405–415. doi: 10.1006/FSIM.1998.0197
- Vielma JR, Bonilla E, Chacín-Bonilla L, et al (2014) Effects of melatonin on oxidative stress, and resistance to bacterial, parasitic, and viral infections: A review. *Acta Tropica* 137:31–38. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.04.021
- Wai MGC, Jun WWW, Yee YAP, et al (2014) A review of pinealectomy-induced melatonin-deficient animal models for the study of etiopathogenesis of adolescent idiopathic scoliosis. *International Journal of Molecular Sciences* 15:16484–16499. doi: 10.3390/ijms150916484
- Wang Z, Sun Z, Song W, et al (2011) Oxidative stress in the zebrafish (*Danio rerio*) under exposure to menadione. *International Conference on Human Health and Biomedical Engineering* 881–884. doi: 10.1109/HHBE.2011.6028963

- Wedemeyer GA, McLeay D, Goodyear CP (1984) Assessing the tolerance of fish and fish populations to environmental stress: The problems and methods of monitoring. 164–195.
- Wendelaar Bonga SE (1997) The stress response in fish. *Physiological reviews* 77:591–625. doi: stress physiologie comportement cortisol cerveau hypophyse catecholamine osmoregulation branchie
- Weyts FA, Flik G, Verburg-van Kemenade BM (1998) Cortisol inhibits apoptosis in carp neutrophilic granulocytes. *Developmental and comparative immunology* 22:563–72.
- Zhang J, Shen H, Wang X, et al (2004) Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere* 55:167–74. doi: 10.1016/j.chemosphere.2003.10.048
- Zhdanova I V, Wang SY, Leclair OU, Danilova NP (2001) Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish. *Brain research* 903:263–8.
- Zimmermann FF, Altenhofen S, Kist LW, et al (2016) Unpredictable Chronic Stress Alters Adenosine Metabolism in Zebrafish Brain. *Molecular Neurobiology* 53:2518–2528. doi: 10.1007/s12035-015-9270-7

Figura 1 Perfil de contagem células de defesa sanguínea de *zebrafish* submetidos ao estresse crônico (C-) e tratados com diazepam (C+) e melatonina (Melt. 1; Melt. 2). (A) Linfócitos (%) no sangue. (B) Trombócitos (%) no sangue. ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey. * significa diferença estatística determinada por $p < 0,05$. Naïve: grupo controle. (Figura criada com auxílio do *software* GraphPad Prism versão 7.01)

Figura 2 Caracterização do perfil de estresse oxidativo associado à formação de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey. * significa diferença estatística determinada por $p < 0,05$. Naïve: grupo controle. (Figura criada com auxílio do *software* GraphPad Prism versão 7.01)

Figura 3 Cortisol corporal (ng / g) de *zebrafish* submetidos ao estresse crônico (C-) e tratados com diazepam (C+) e melatonina (Melt. 1; Melt. 2). ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey. * significa diferença estatística determinada por $p < 0,05$. Naïve: grupo controle. (Figura criada com auxílio do *software* GraphPad Prism versão 7.01)

Figura 4 Análise comportamental de *zebrafish* submetidos ao estresse crônico (C-) e tratados com diazepam (C+) e melatonina (Melt. 1; Melt. 2). (A) Atividade locomotora (média de velocidade em cm / s). (B) Estado de atividade (distância percorrida em cm). (C) Comportamento tipo-ansioso (percentual de permanência na profundidade em s). (D) Estado de mobilidade (percentual de tempo imóvel). (A)(D) Kruskal-wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn's; (B)(C) ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey. * significa diferença estatística determinada por $p < 0,05$. Naïve: grupo controle. (Figura criada com auxílio do *software* GraphPad Prism versão 7.01)

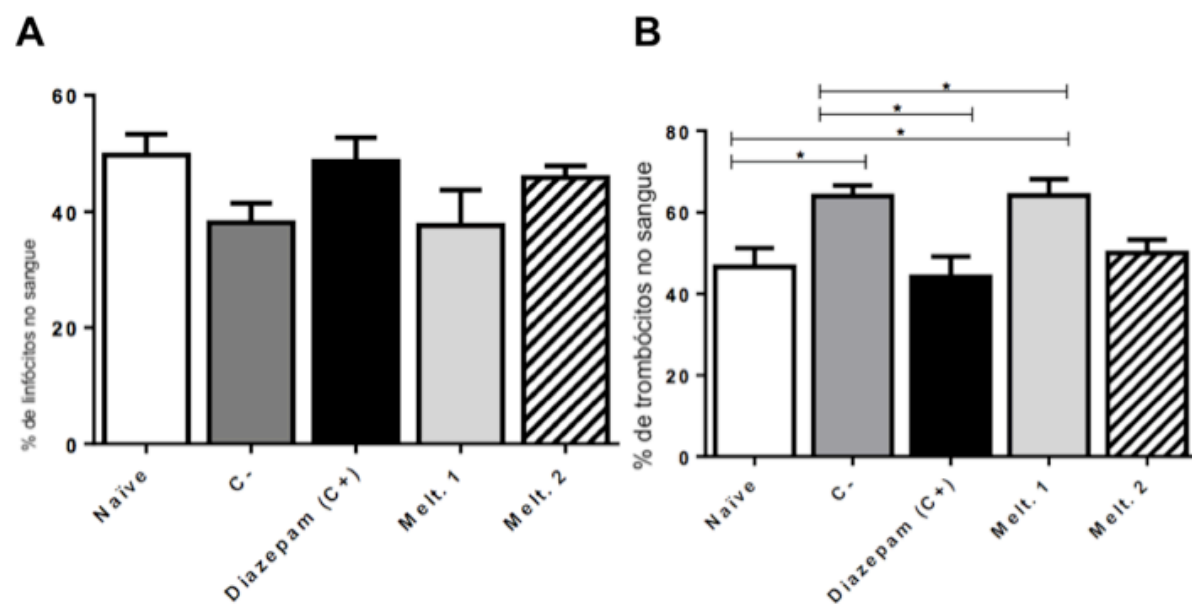


Figura 1

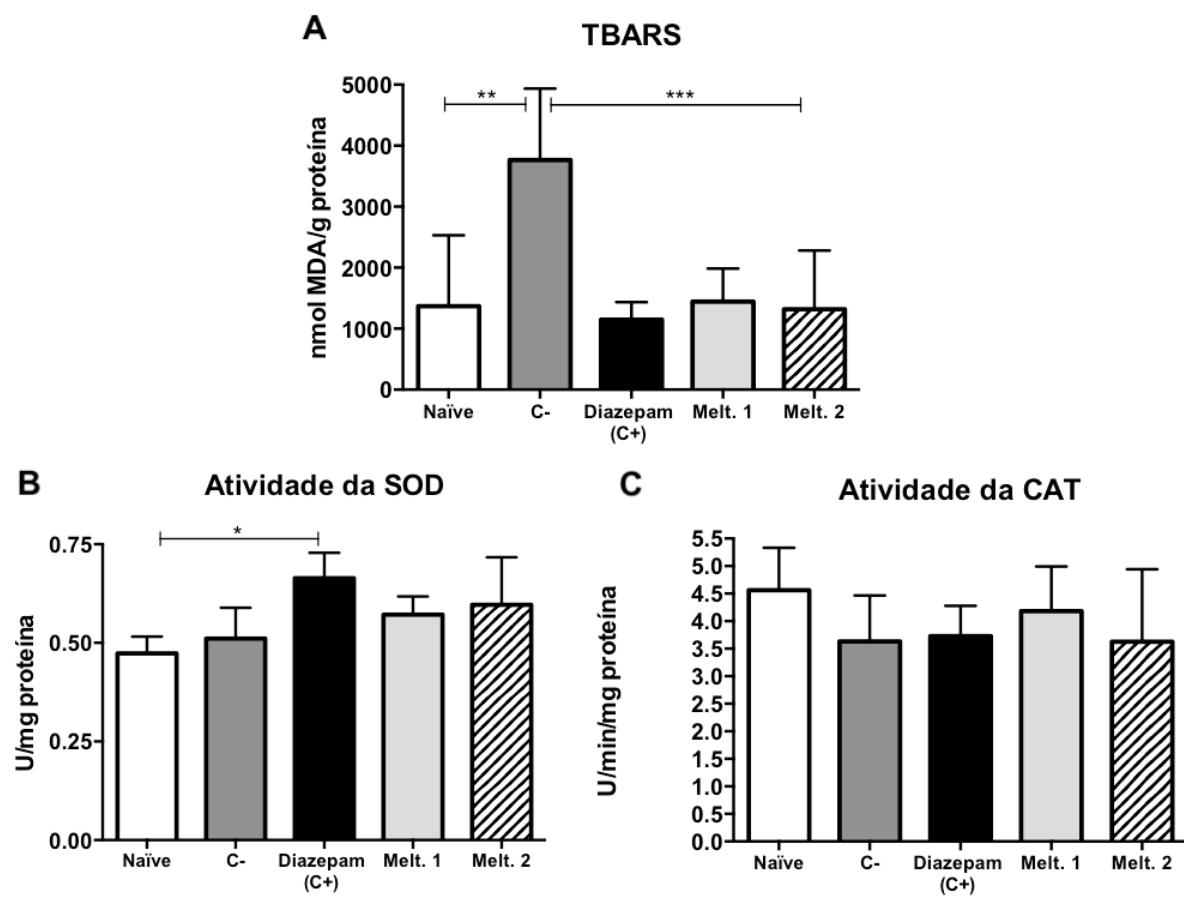


Figura 2

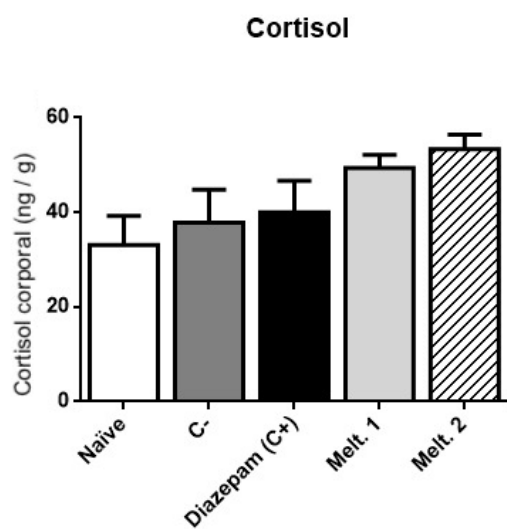


Figura 3

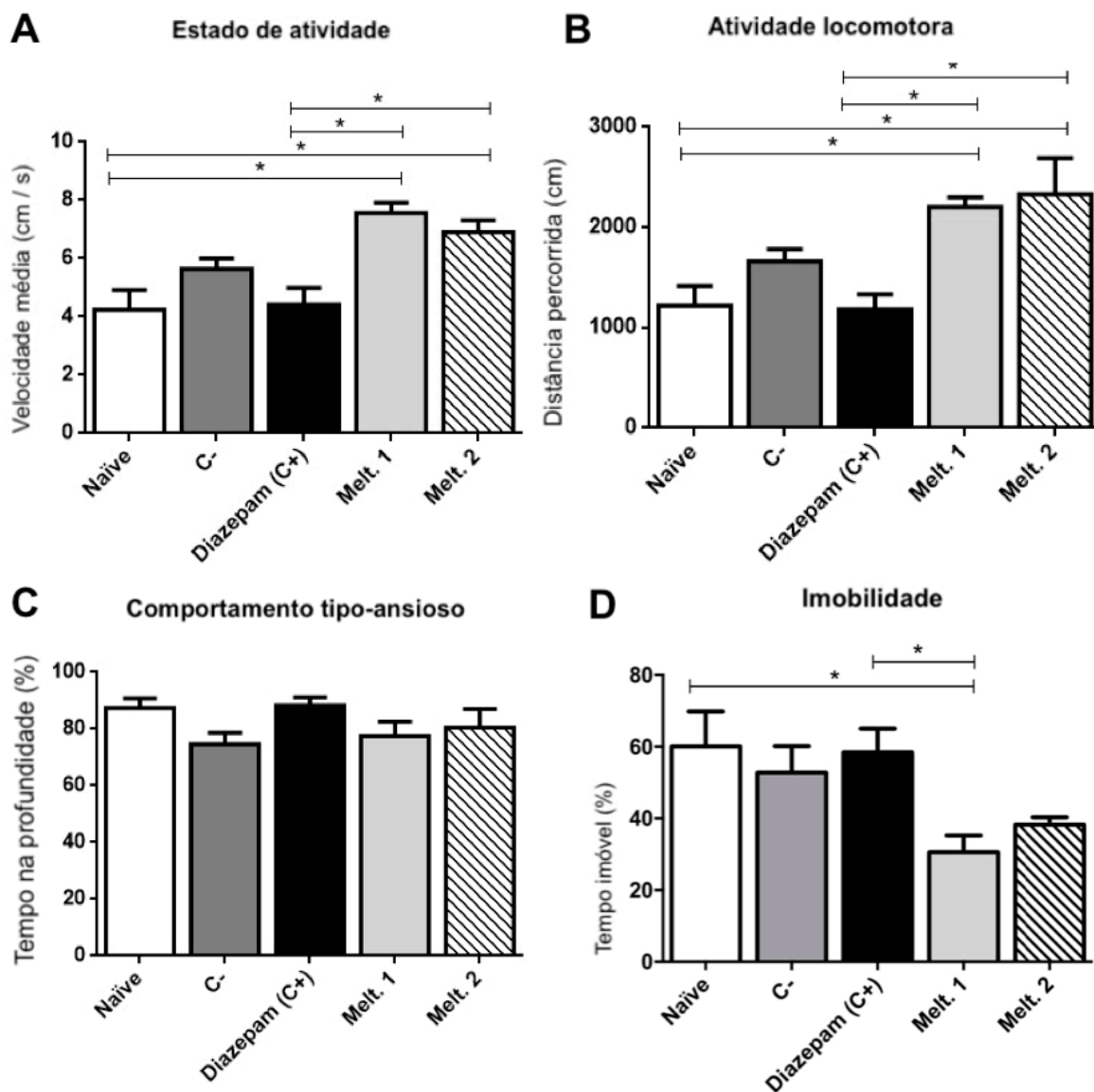


Figura 4