



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

EMERSON FEIO PINHEIRO

**ATIVAÇÃO DO RECEPTOR CANABINÓIDE TIPO 1 (CB1r) PREVINE O ESTRESSE
OXIDATIVO CEREBRAL E INIBE O COMPORTAMENTO TIPO AGRESSIVO EM
Danio rerio (ZEBRAFISH)**

BELÉM

2022

EMERSON FEIO PINHEIRO

**ATIVAÇÃO DO RECEPTOR CANABINÓIDE TIPO 1 (CB1r) PREVINE O ESTRESSE
OXIDATIVO CEREBRAL E INIBE O COMPORTAMENTO TIPO AGRESSIVO EM
Danio rerio (ZEBRAFISH)**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular – Área de concentração em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva

BELÉM

2022

EMERSON FEIO PINHEIRO

**ATIVAÇÃO DO RECEPTOR CANABINÓIDE TIPO 1 (CB1r) PREVINE O ESTRESSE
OXIDATIVO CEREBRAL E INIBE O COMPORTAMENTO TIPO AGRESSIVO EM
Danio rerio (ZEBRAFISH)**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular – Área de concentração em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva (Orientador)

Prof (a) Dr^a. Karen Renta Herculano Matos Oliveira

Prof. (a) Dr. Alan Barroso Araújo Grisólia

BELÉM

2022

RESUMO

A agressão é um conjunto de ações complexas que envolvem diversos fatores de natureza genética, neurofisiológica, hormonal e comportamental. Além disso, o estado redox cerebral também pode influenciar o comportamento agressivo em diferentes espécies. Assim, moduladores desse processo podem influenciar na expressão de episódios agressivos, dentre eles está o Sistema Endocanabinóide que atua como importante neuromodulador do SNC, além de promover um efeito antioxidante em diferentes condições. No entanto, sua participação na modulação de comportamentos agressivos precisa de maior compreensão. Nesse contexto, este estudo avaliou o papel do receptor canabinóide tipo 1 (CB1r) no estado redox cerebral e no comportamento agressivo em *Danio rerio* (zebrafish). Para isso, 68 animais foram subdivididos em grupos: (a) Controle (n=26), (b) ACEA (n=30) e (c) AM-251 (n=12), todos tratados com as drogas de interesse: (a) Veículo (NaCl 0,9%); (b) agonista ACEA 1 mg/kg; (c) antagonista o AM-251 1 mg/kg. Os animais foram isolados aos pares, sem contato físico por 24 horas, seguido de pré-tratamento e após 30 minutos de farmacocinética as interações sociais foram filmadas por 30 minutos, os indivíduos foram identificados como Dominantes ou Subordinados e os cérebros foram coletados para avaliação do estado redox cerebral desses indivíduos. Nossos resultados demonstraram, pela primeira vez, que a ativação do CB1r pelo agonista ACEA modula o comportamento do tipo-agressivo e por consequente interferiu parcialmente no estabelecimento da hierarquia social em zebrafish, através de uma mecanismo redox-independente. Sugerimos, assim, que o tratamento agudo com alvo ao CB1r é uma ferramenta neurofarmacológica útil para elucidar o papel do SEC na interação social e no comportamento agressivo, permitindo translacionar com inúmeras patologias que tenham a agressividade como desordem comportamental.

Palavras-chave: Agressão, Receptor CB1, Sistema Endocanabinóide, Estresse Oxidativo, Zebrafish.

ABSTRACT

Aggression is a set of complex actions that involve several factors of a genetic, neurophysiological, hormonal and behavioral nature. Furthermore, the brain redox state can also influence aggressive behavior in different species. Thus, modulators of this process can influence the expression of aggressive episodes, between them is the Endocannabinoid System that acts as the main neuromodulator of the CNS, in addition to exerting an antioxidant effect in different conditions. However, its participation in the modulation of aggressive-like behavior needs to be better understood. In this context, this study evaluated the role of cannabinoid receptor type 1 (CB1r) in brain redox state and aggressive-like behavior in *Danio rerio* (Zebrafish). For this, 64 animals were subdivided into groups: (a) Control (n=26), (b) ACEA (n=30) and (c) AM-251 (n=12), all treated with the drugs of interest: (a) Vehicle (NaCl 0.9%); (b) ACEA agonist 1 mg/kg; (c) 1 mg/kg AM-251 antagonist. The animals were isolated in pairs, without physical contact for 24 hours, followed by pre-treatment and after 30 minutes of pharmacokinetics, the fights were filmed for 30 minutes, the individuals were identified as Dominant or Subordinate and the brains were collected for evaluation of the state brain redox of these individuals. Our results demonstrate, for the first time, that the activation of CB1r by the ACEA agonist modulates aggressive-like behavior and, consequently, partially interferes with the establishment of social hierarchy in Zebrafish, through a redox-independent mechanism. We suggest, therefore, that acute treatment targeting CB1r is a useful neuropharmacological tool to elucidate the role of CES in social interaction and aggressive behavior, allowing a translation with numerous pathologies that have aggression as a behavioral disorder.

Keywords: Aggression, Endocannabinoid System, CB1 receptors, Oxidative stress, Zebrafish.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais vias para a biossíntese e degradações de anandamida (A) e 2-AG (B) a parti dos precursores membranares.....	17
Figura 2: Figura ilustrativa de uma sinapse glutamatérgica representando uma sinalização clássica do Sistema Endocanabinóide.....	18
Figura 4: <i>Danio rerio</i> (zebrafish), linhagem <i>Short-finn</i>	26
Figura 3: Figura ilustrativa da distribuição anatômica do CB1r no encéfalo do <i>Danio rerio</i> , representado pela distribuição em escala de densidade.....	24
Figura 5: Isoformas dos canabinóides sintéticos: Agonista ACEA e antagonista AM-251 do CB1r.....	30
Figura 6: Cronograma dos experimentos comportamentais.....	32
Figura 7: Desenho experimental dos ensaios bioquímicos para quantificar os níveis de peroxidação lipídica e tióis não proteicos	34
Figura 8: Quantificação dos comportamentos agressivos e defensivos durante os cinco minutos iniciais e finais dos testes comportamentais.....	37
Figura 9: Efeito da ativação de CB1rs nos níveis de peroxidação lipídica e NPSH no cérebro de zebrafish submetidos a interações sociais.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG	2-Araquidonoil-glicerol
ACEA	Araquidonil-2-cloroetilamida
AEA	N-araquidonoiletanolamina/Anandamida
AC	Adenilil Clicase
AM-251	1-(2,4-Diclorofenil)-5-(4-iodofenil)-4-metil-N-(1-piperidinil)-1H-pirazole-3-carboxamida
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
CBD	Canabidiol
CB1r	Receptor Canabinóide tipo 1
CB2r	Receptor Canabinóide tipo 2
CB3r	Receptor Canabinóide tipo 3
eCBs	Endocanabinóides
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio
FAAH	Amina hidrolase de ácidos graxo
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HPA	Eixo hipotalâmico pituitário-adrenal
5-HT	5-hidroxitriptamina
i.a	Intra-abdominal
MAGL	Monoacilglicerol lipase
MAO-A	Monoaminaoxidade-A
MDA	Malondialdeído
NMFI	N-metil-2-fenilindol

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

THC	Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
SEC	Sistema Endocanabinóide
SNC	Sistema nervoso central

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Sumo Bem, fonte de toda a Graça e Ciência. A Ele toda minha gratidão por permitir trilhar caminhos inimagináveis, revelando seus mistérios e sabedoria.

Agradeço toda a minha família, representada pelos meus pais Nilma Feio e Jorge Pinheiro; minha irmã Giselle Pinheiro; minha avó Doralice Carvalho; ao meu grande amor Jamille Cardoso; meu irmão Luan Ferreira, que foram meu suporte nesta caminhada de lutas e conquistas.

Minha gratidão a família LNE, por abrirem as portas do Coração e da Ciência, permitindo-me almejar sonhos maiores. Em especial agradeço ao “grupo do Peixe”: Nadyme Assad, Lucas Luz, Patrick Cardoso e nessa reta final, em especial, Mateus Silva e Luana Carvalho por todo suporte, companheirismo e ensinamentos.

Gratidão ao Laboratório NTPC, na pessoa Prof. Dr. Amauri Gouveia Jr, pela grande e copiosa oportunidade de trabalhar como Iniciação Científica sob sua orientação, tempo de início deste trabalho que hoje está dando frutos.

Ao meu grande orientador, professor Dr. Anderson Manoel Herculano, por me adotar como filho, sendo o suporte para essa caminhada de sonhos e conquistas, sempre preocupado com a formação humana e profissional. Infinita gratidão pelas portas abertas.

Agradeço a todos meus amigos de caminhada de Fé, que sempre rezaram pelo meu sucesso profissional e pessoal.

Por fim, agradeço à Universidade Federal do Pará, CNPQ e CAPES por todo apoio acadêmico e financeiro.

Obrigado a todos!

Dedico à Doranice Carvalho Feio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. AGRESSÃO: CONSIDERAÇÕES GERAIS	11
1.2. SISTEMA ENDOCANABINÓIDE.....	16
1.3. O SISTEMA ENDOCANABINÓIDE E O COMPORTAMENTO AGRESSIVO...	20
1.4. ESTRESSE OXIDATIVO E AGRESSÃO.....	22
1.5. O ZEBRAFISH COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DO COMPORTAMENTO TIPO-AGRESSIVO.....	23
2. OBJETIVO	29
2.1. OBJETIVO GERAL.....	29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. METODOLOGIA	30
3.1. ANIMAIS E ALOJAMENTO.....	30
3.2. DROGAS E REAGENTES	30
3.3. TESTE COMPORTAMENTAL.....	31
3.4. GRUPOS E TRATAMENTOS	31
3.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	33
3.5.1. Peroxidação lipídica.....	33
3.5.2. Ensaio de Tiol não Proteico (NPSH).....	33
3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	34
4. RESULTADOS	35
4.1. A ATIVAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS CB1rs MODULA O COMPORTAMENTO TIPO-AGRESSIVO EM ZEBRAFISH	35
4.2. A ATIVAÇÃO DOS CB1rs MODULA O COMPORTAMENTO TIPO-AGRESSIVO ATRAVÉS DE UMA VIA REDOX-INDEPENDENTE	38
5. DISCUSSÃO.....	40
6. REFERÊNCIAS	46
7. ANEXO1: Dados comportamentais.....	52
8. ANEXO 2: Dados Bioquímicos.....	53
9. ANEXO 3: Certificado de Menção Honrosa pela XLII Reunião da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento.....	54

1. INTRODUÇÃO

1.1. AGRESSÃO: CONSIDERAÇÕES GERAIS

A agressão é um conjunto de ações complexas, evolutivamente conservadas, expressa em contexto de conflito de interesses entre dois ou mais indivíduos em função de disputa por recursos limitados, como território, alimento e parceiros reprodutivos (NELSON; TRAINOR, 2007). Essas ações podem ser direcionadas a outro indivíduo com fins ofensivos ou defensivos, assegurando maiores possibilidades de autoproteção e reprodução (FLANIGAN; RUSSO, 2019; NELSON; CHIAVEGATTO, 2001; TAKAHASHI et al., 2018). Embora a agressão em animais possa ser adaptativa (fisiológica), esse comportamento em humanos evoluiu como mecanismo de defesa e proteção. No entanto, a maioria das ações agressivas em nossa espécie é mal-adaptativa (patológica), manifestando-se de forma inadequada ou desproporcional ao estímulo eliciador, infligindo conceitos sociais básicos, normalmente envolve ações violentas direcionados para si ou para outrem (ALLEN; ANDERSON; BUSHMAN, 2018; CRAIG A; BRAD J, 2002). Por isso, devido a natureza multifatorial da agressão e pelo fato de poder acontecer em diversos contextos, há dificuldades em buscar explicações sobre a dinâmica molecular e fisiológica desse comportamento (HUBER; BRENNAN, 2011).

O comportamento agressivo em humanos compartilha semelhanças com os de animais não humanos, mas diferem da maioria deles em sua complexidade. Enquanto as normas sociais definem os limites do comportamento agressivo apropriado, as ações inadequadas na forma de violência interpessoal representam sérios problemas para a sociedade (FERRIS et al., 2008). Essa ampla definição desafiou os pesquisadores a diferenciar entre as ações patológicas e fisiológicas levando em consideração seu aspecto evolutivo (ZASLER; MARTELLI; JACOBS, 2013). Para melhorar essa compreensão, a teoria do Modelo Geral da Agressão (MGA) foi proposta como uma estrutura abrangente e integrativa para entender a agressão humana e todas as suas manifestações. Essa teoria considera que esse comportamento é o resultado das interações entre os fatores genéticos, neurobiológicos e psicossociais (ALLEN; ANDERSON; BUSHMAN, 2018). Além disso, o MGA inclui elementos de muitas teorias de agressão de domínio específico, por exemplo: teoria da neoassociação cognitiva, teoria da aprendizagem social, teoria do script, teoria da transferência de excitação e teoria da interação social (ALLEN; ANDERSON;

BUSHMAN, 2018; CRAIG A; BRAD J, 2002). Essa unificação de fatores e domínios torna o MGA essencial para entender a agressão humana em seus inúmeros contextos.

Na primeira infância (2 a 6 anos) a falta de afeto, rejeição dos pais, hostilidade materna e pré-disposição genética têm sido associados a comportamentos disruptivos, podendo ser o precursor de perfis antissociais (MURRAY-CLOSE; OSTROV, 2009). Além disso, estudos indicam que a exposição de crianças à conflitos interparentais frequentes, intensos e violentos interferem diretamente no desenvolvimento psicossocial e no controle da reatividade/impulsividade (CRAIG A; BRAD J, 2002). Alterações mais graves em crianças podem ser observadas em função dos maus-tratos (psicológico ou físico) os quais geram mudanças de longo prazo nos sistemas de estresse neuroendócrino, especificamente na desregulação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA). Esses estudos demonstraram que adolescentes e adultos maltratados na primeira infância, tendem a apresentar desregulação nos níveis de cortisol basal e na funcionalidade do eixo HPA em comparação com indivíduos saudáveis (não-maltratados), prejudicando a interação social desses indivíduos (LIU et al., 2020). Esses achados estão em consonância com a teoria de aprendizagem social, essa teoria postula que as respostas agressivas são adquiridas da mesma forma que outros comportamentos sociais complexos – seja pela experiência direta ou pela observação - e “essa experiência de vida” pode potencializar comportamentos disruptivos em indivíduos pré-dispostos geneticamente na infância, adolescência ou fase adulta (CRAIG A; BRAD J, 2002).

Na fase adulta, ações agressivas desordenadas, geralmente, estão vinculadas a um *score* clínico de transtornos psiquiátricos, conforme detalhado no Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais 5.^a edição (DSM-IV) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014). Nesse caso, inclui dependência de drogas, depressão, ansiedade, esquizofrenia, transtorno de personalidade, transtorno do espectro autista e, também, em condições de estresse agudo ou crônico (ZASLER; MARTELLI; JACOBS, 2013). Além disso, comportamentos agressivos em portadores de demência – Parkinson e Alzheimer – são bastante preocupante devido seus efeitos potencializadores no curso da doença (WOLF; GOLDBERG; FREEDMAN, 2018). A partir desse ponto, será abordado o comportamento agressivo patológico, essencialmente os fatores neurobiológicos e sociais segundo as suas causas, consequências e suas principais intervenções clínicas e farmacológicas. Primeiramente, as doenças neurodegenerativas e os transtornos psiquiátricos acometem cerca de um bilhão de pessoas no mundo e essas comorbidades

geram inúmeros efeitos colaterais aos indivíduos, familiares e sociedade (FEIGIN et al., 2021; STUMP, 2007). Apesar das disfunções celulares e moleculares serem diferentes entre essas patologias é possível observar a sobreposição de sintomas clínicos e comportamentais, em destaque estão os comportamentos agressivos, impulsivos e violentos (ZASLER; MARTELLI; JACOBS, 2013). Por ser um comportamento inato, o comportamento agressivo é observado desde a primeira infância, e ao longo da evolução humana “refinou-se” como um recurso fundamental para lidar com situações estressoras (HUBER; BRENNAN, 2011). De modo mais específico, esse comportamento é classificado em dois gêneros: a agressão reativa (impulsiva e hostil) a qual refere-se à manifestação impulsivas em resposta à provocação ou ameaça; e a agressão proativa (instrumental) a qual normalmente destina-se a obter benefícios pessoais de forma premeditada (WRANGHAMA, 2017).

Os comportamentos agressivos fisiológicos ou patológicos são organizados e controlados por um circuito neural distribuído, ou seja, subconjuntos de neurônios interconectados que transmitem informações sensoriais e motoras de/para locais de integração (FERRIS et al., 2008). Dessa forma, o substrato neuronal envolvido na agressão reativa geralmente está associada ao córtex orbitofrontal (COF), córtex pré-frontal (CPF), córtex pré-frontal dorsolateral (CPF DL), córtex cingulado anterior (CCA), giro temporal superior e amígdala. Esse padrão de ativação, normalmente, é observado frente a experiências com estressores, por exemplo: provocações, exclusão social, maus-tratos, transtornos de humor, transtorno de estresse pós-traumático, transtorno de personalidade borderline ou associado a injúrias em regiões específicas do tecido cerebral (KOLLA; BORTOLATO, 2020). Para a agressão proativa/instrumental, apesar dos poucos trabalhos direcionados a esse subtipo, é observado um aumento da densidade de matéria cinzenta no CPF, densidade reduzida de matéria cinzenta no córtex cingulado posterior e aumento da conectividade funcional entre o pré-cúneo esquerdo e o CPF (ZHU; ZHOU; XIA, 2019). Esses estudos dividem a agressão proativa em três traços distintos: 1) uso da força ou persuasão para conseguir benefícios próprios; 2) comportamento “frio” e planejado, podendo portar ferramentas danosas para conseguir o objetivo final, sem um contexto estressor ou ameaçador; 3) capacidade ou tendência de baixo nível de cognição moral e emoção, incluindo falta de empatia para executar atos agressivos. Embora os relatos apontem uma ativação neurobiológica distinta entre esses subtipos de agressão, ambos elementos reativos e proativos podem coexistir na mesma manifestação agressiva (ZHU; ZHOU; XIA, 2019).

Em um contexto mais amplo, a violência doméstica, violência sexual, violência no trânsito, violência no ambiente de trabalho, assassinatos, suicídios e outras inúmeras manifestações de violência demonstram as abrangentes manifestações do comportamento agressivo (DAHLBERG; KRUG, 2006; WRANGHAM, 2019). Esse cenário justifica o aumento exponencial dos estudos direcionados a investigar às causas e consequências desses eventos, sendo de interesse a inúmeras disciplinas acadêmicas - genética comportamental, evolução, neurociência, psicologia, sociologia, criminologia dentre outras – destacando-se a ciência biomédica (HUBER; BRENNAN, 2011). Inúmeros estudos utilizando modelos animais trouxeram importantes avanços na compreensão da neurobiologia da agressão, essas pesquisas foram importantes no direcionamento das melhores intervenções clínicas, farmacológicas e sociais (NELSON; CHIAVEGATTO, 2001; WATANABE; YAMAMOTO, 2015). No entanto, mesmo com importantes achados, muitos mecanismos fisiopatológicos precisam ser elucidados para melhor compressão da dinâmica molecular e comportamental por trás dessas disfunções.

Para mimetizar o comportamento agressivo em ambiente de laboratório, os pesquisadores têm utilizado o isolamento social associado com a dominância (ALONSO et al., 2011; CAVALLINO et al., 2020; FOX et al., 1997; KRUK, 1991; MILLER et al., 2017; TAKAHASHI et al., 2018; WAY et al., 2015). Esse procedimento aumenta a agressividade, além de promover a disputa pelo estabelecimento ou manutenção da hierarquia social. Essa condição, denominada “agressão induzida pelo isolamento” é propensa a manipulações farmacológicas, mostrando-se um modelo interessante no estudo da agressividade (MUMTAZ et al., 2018). Os etólogos observaram que a hierarquia social é uma forma de manifestação de dominância presente em várias espécies de vertebrados (por exemplo: teleósteos, aves, répteis, roedores e primatas não-humanos). Essa classificação em sociedades animais tendem a ser determinada pela força física, enquanto na sociedade humana, além da força física, fatores cognitivos são considerados, como a inteligência e a estabilidade emocional (WATANABE; YAMAMOTO, 2015). Assim, em nossa sociedade, esse fenômeno mais refinado de dominância social é baseado em experiências de interações ou observações. Dentro de um contexto, um exemplo clássico de disputa por dominância é observado em grupos novos ou emergentes, por exemplo: Em uma sala de aula no início de um ano letivo sempre é observado altos níveis de conflitos entre os alunos, à medida que o *status* social se estabelece os níveis dos conflitos tendem a diminuir (PELLEGRINI et al., 2007). Esse declínio gradativo dos conflitos deve-se ao fato de indivíduos subordinados reconhecerem que os custos fisiológicos e emocionais de

desafiar um indivíduo mais dominante superam os benefícios. Essa perspectiva também é considerada para os indivíduos de alto status social, estes provavelmente não desafiam novamente os sujeitos subordinados porque há poucos benefícios (PELLEGRINI et al., 2007).

Essa dominância social intrínseca está presente em todas as nossas relações e a homeostase fisiológica dos indivíduos inferem em relações sociais saudáveis entre os pares (ALLEN; ANDERSON; BUSHMAN, 2018; NELSON; TRAINOR, 2007). Por isso, quaisquer disfunções genéticas, hormonais, emocionais e neuronais podem comprometer diretamente curso natural das relações humanas, resultando em episódios agressivos desordenados como manifestadas nas doenças neurodegenerativas, transtornos psiquiátricos e casos pós-traumáticos (ALLEN; ANDERSON; BUSHMAN, 2018; WOLF; GOLDBERG; FREEDMAN, 2018). Identificar essas vias moduladoras é essencial para o desenvolvimento de novas estratégias que minimizem os danos fisiológicos e sociais provenientes dessas desordens comportamentais (FLANIGAN; RUSSO, 2019). No entanto, pela complexidade ética dos estudos em seres humanos as pesquisas nessa finalidade são limitadas, por isso a ciência básica utiliza modelos animais para desenvolver terapias mais eficientes. É importante frisar, também, que essa comparação translacional não é simples, pois cada espécie tem sua particularidade, sendo o papel dos pesquisadores encontrar um elo comum entre os modelos (TAKAHASHI et al., 2018).

Vários estudos encontraram uma associação entre o sistema serotoninérgico e os subtipos de agressividade reativa e proativa (para revisão: KOLLA; BORTOLATO, 2020). Esses estudos mostram que disfunções nos receptores serotoninérgicos (5-HT1A e 5-HT1B), nos transportadores de serotonina, nas enzimas de síntese e de degradação tem estreita relação com comportamentos violentos e impulsivos (CARMICHAEL; LOCKHART, 2012; KOLLA; BORTOLATO, 2020). Porém, a modulação farmacológica desse sistema possui eficácia limitada e inúmeros efeitos colaterais (CARMICHAEL; LOCKHART, 2012). Outros alvos farmacológicos já foram testados, como moduladores GABAérgicos, glutamatérgicos, dopaminérgicos entre outros, todos apresentam limitações relevantes (NELSON; TRAINOR, 2007). Nesse cenário, o Sistema Endocanabinóide (SEC) emergiu como alvo terapêutico interessante no tratamento da agressividade, devido sua função neuromoduladora do SNC e sua interação com diversos sistemas neuroquímicos (HARTMANN et al., 2019). A seguir será explorado as características moleculares, funcionais e moduladoras do SEC e sua associação com a comportamento agressivo.

1.2. O SISTEMA ENDOCANABINÓIDE

O Sistema Endocanabinóide (SEC) foi descrito pela primeira vez na década de 1990 em estudos que investigavam o efeito psicoativo da *cannabis sativa* ou popularmente conhecida como “maconha/marijuana”(GAONI; MECHOULAM, 1964). Esse sistema é constituído pelos receptores canabinóides do tipo 1 (CB1r) e tipo 2 (CB2r)(MATSUDA et al., 1990; MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993); ligantes endógenos ou endocanabinóides (eCBs) como a N-araquidonoiletanolamina (AEA) e o Araquidonoilglicerol (2-AG); enzimas de síntese como a fosfolipase D para AEA e diaciglicerol lipase para o 2-AG; pelas enzimas de degradação intracelular como a Amina hidroxilase de ácidos graxos (FAAH – *fatty acid amide hydrolase*) e a Monoacilglicerol lipase (MAGL); para o transporte dos endocanabinóides através da membrana, defende-se a hipótese de um putativo transportador de AEA (AMT) e de facilitadores de solubilidades intracelulares (FABPs - *fatty acid binding proteins*) (DAINESE et al., 2020; MECHOULAM; PARKER, 2013; WANG; UEDA, 2009).

A síntese dos eCBs inicia após a despolarização dos neurônios pós-sinápticos seguida da ativação das fosfolipases que convertem os seus precursores membranares em AEA ou 2-AG (Figura 1) (CHEVALEYRE; TAKAHASHI; CASTILLO, 2006; WANG; UEDA, 2009). Esses ligantes são sintetizados sob demanda - sem armazenamento em vesículas sinápticas - atuando, aparentemente, como mensageiros lipídicos difusíveis, sendo uma das exceções à lei da polarização dinâmica, proposta por Ramon y Cajal (1906) que postula que as conexões neuronais procedem dos terminais axonais pré-sinápticos para dendritos pós-sinápticos. Nesse caso, os eCBs são mensageiros retrógrados e ao serem liberados do neurônio pós-sináptico se ligam aos CB1rs pré-sinápticos iniciando uma cascata de reações intracelulares (SIGNALING et al., 2012). Curiosamente, existem relatos recentes na literatura de uma sinalização anterógrada, com a presença de CB1rs nos dendritos pós-sinápticos (para leitura: SIGNALING et al., 2012).

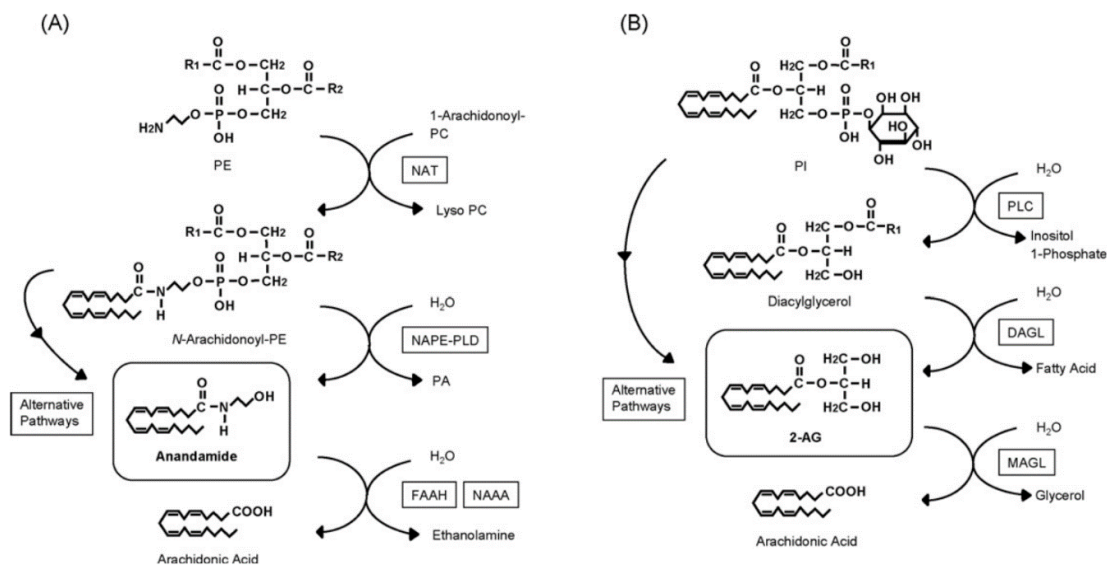


Figura 1: Principais vias para a biossíntese e degradações de anandamida (A) e 2-AG (B) a partir dos precursores membranares. (adaptado: Wang et al., 2008).

O principal receptor canabinóide CB1r pertence à superfamília dos receptores acoplados à proteína G, com sete domínios transmembranares estão ligados a proteína Gi/0, embora interajam com Gs ou Gq em diferentes tipos celulares (MECHOULAM; PARKER, 2013). No geral, os principais ligantes endógenos (AEA e 2-AG), fitocanabinóides (THC e Canabidiol) ou ligantes sintéticos (agonista ACEA e antagonista AM-251) se ligam aos CB1rs desencadeando cascatas intracelulares com progressão em três etapas subsequentes: (1) Inibe a ativação da Adenilato Ciclase (AC), com subsequente diminuição da conversão de ATP em AMP cíclico, seguido da diminuição da atividade da proteína quinase A (PKA); (2) Aumento de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK); (3) inibição de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagens (tipo N e P/Q) e a facilitação da atividade dos canais de K^{+} , o que favorece uma hiperpolarização neuronal. Essa dinâmica resulta na modulação das sinapses (excitatórias ou inibitórias) através da diminuição da liberação de neurotransmissores (ex: monoaminas, catecolaminas, GABA e Glutamato) (GULLAPALLI et al., 2010; MECHOULAM; PARKER, 2013; MUNRO; THOMAS; ABU-SHAAR, 1993; SIGNALING et al., 2012; WANG; UEDA, 2009). Este efeito pode ser bifásico, dependendo da localização desses receptores no meio intracelular, da região anatômica ou da concentração de drogas utilizadas em tratamentos (REY et al., 2012). A via de sinalização dos eCBs na sinapse é descrita em maiores detalhes na Figura 2.

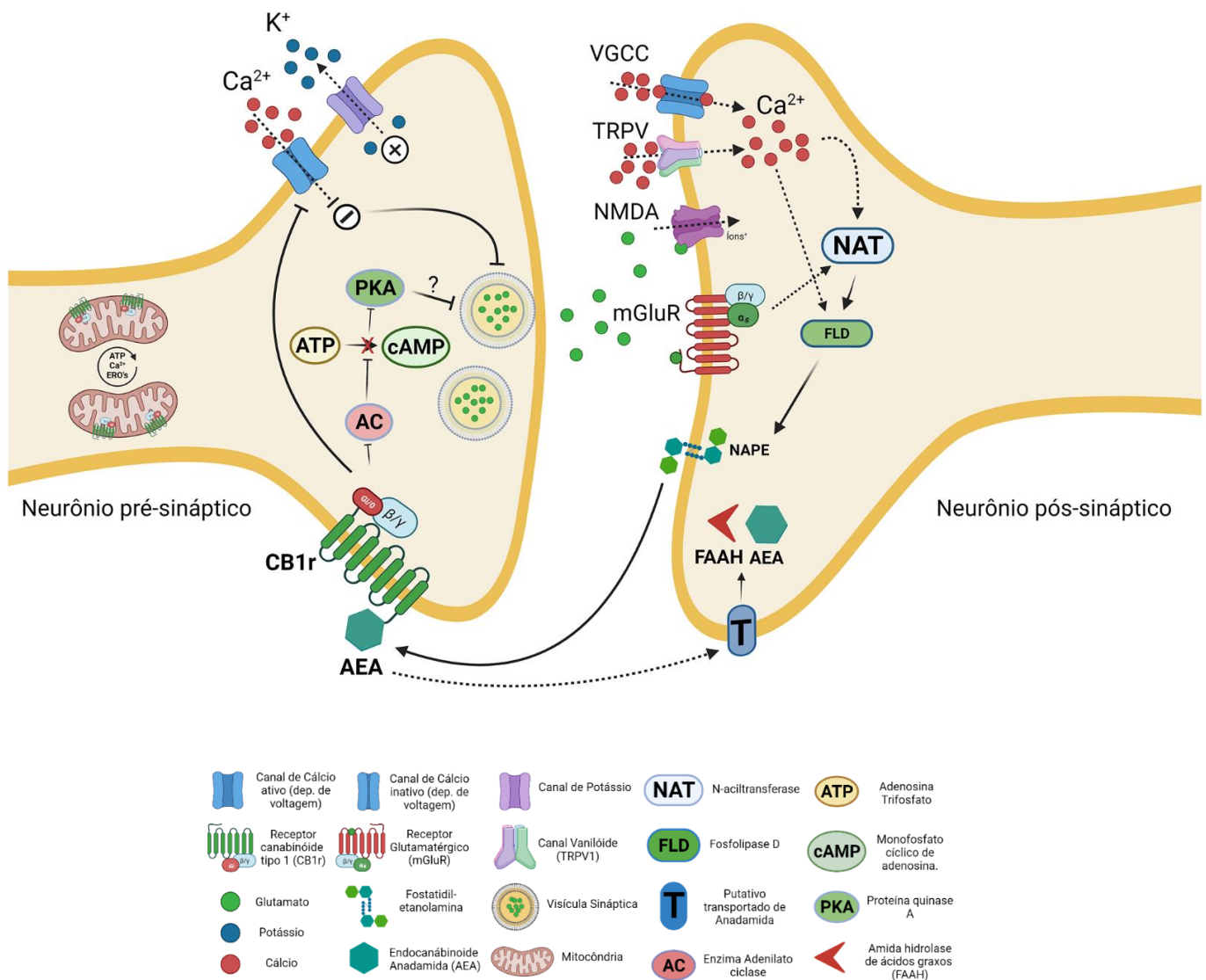


Figura 2: Sinalização sináptica de curto prazo mediada por endocanabinóides em neurônio glutamatérgico. (1) Após a despolarização do neurônio pós-sináptico mediada pelo neurotransmissor Glutamato, ocorre o influxo de Ca^{2+} via canal de Ca^{2+} dependente de voltagem (VGCCs). Outros receptores, também, podem mediar o influxo de Ca^{2+} ex: TRPV1. (2) O Ca^{2+} é o sinalizador que dá início a síntese sob demanda dos endocanabinóides através da ação da NAT que ativa a FLD, resultando na biossíntese de AEA. (3) O eCB é liberado na fenda sináptica ligando-se de forma retrograda ao CB1r pré-sináptico. (4) O CB1r ativado inicia reações intracelulares que resulta na diminuição da liberação das vesículas sinápticas, nesta etapa é importante destacar o bloqueio do influxo de Ca^{2+} e a estimulação do efluxo de K^+ . (5) O eCB é transportado através do putativo transportador para ser degradado no neurônio pós-sináptico (6) degradação da AEA pela FAAH. Obs: A presença de CB1r na mitocôndria está associado a regulação da homeostase energética e redox do celular. (figura: Autor; BioRender.com; adaptado: Mechoulam et al., 2013).

Os CB1rs são predominantemente expressos no SNC e sua distribuição no encéfalo já foi descrita em várias espécies de vertebrados (LAM; RASTEGAR; STRÄHLE, 2006; MECHOULAM; PARKER, 2013). Alguns estudos demonstraram uma densidade elevada de CB1r em áreas cerebrais importantes: hipocampo, bulbo olfatório, gânglios da base e cerebelo; presença moderada de CB1rs: córtex cerebral (lobo frontal, parietal e cíngulo), amígdala, hipotálamo, núcleo parabraquial, núcleo do trato solitário, prosencéfalo, tronco cerebral, medula espinhal, corno dorsal da medula; baixa densidade de CB1rs: tálamo e restantes núcleos do tronco cerebral, bem como no corno ventral da medula (KENDALL; YUDOWSKI, 2017; PINHO COSTA et al., 2011). No que se refere a localização intracelular desse receptor, destaca-se a alta expressão nas membranas externas de mitocôndrias, podendo regular os níveis intracelulares de ATP, Ca^{2+} e ERO's (BÉNARD et al., 2012). Essas descobertas recentes mostram que além da participação na modulação comportamental, devido a localização estratégica de seus receptores no sistema límbico, o SEC pode estar envolvido no controle da homeostase energética e do estado redox do organismo e esse entendimento representa alvos terapêuticos promissores no tratamento de patologias que tenham uma disfunção nesse equilíbrio (para leitura: BÉNARD et al., 2012; HEBERT-CHATELAIN et al., 2016; JIMENEZ-BLASCO et al., 2020).

O receptor canabinóide tipo 2 (CB2) está localizado predominantemente nas células da glia e nas células hematopoiéticas, estando associado ao sistema imunológico, principalmente na quimiotaxia das células do sistema imune e na liberação de citocinas pró-inflamatórias (KENDALL; YUDOWSKI, 2017). É importante destacar, também, que alguns estudos identificaram um possível CB3r, presente no SNC e sua função ainda está sob investigação (DEMIN et al., 2018; HJORTH et al., 2007; MARICHAL-CANCINO; FAJARDO-VALDEZ; RUIZ-CONTRERAS, 2017). Esse panorama dos principais constituintes do sistema endocanabinóide demonstram a sua complexidade e seu grande potencial no desenvolvimento de fármacos que beneficiem seu aspecto neuromodulador e de sua ampla distribuição no organismo (KENDALL; YUDOWSKI, 2017). Além disso, dada a sua importância cada vez mais evidente é provável que o SEC tenha surgido no início da evolução, devido seu alto grau de conservação entre várias espécies. Estes estudos mostram que 97% do CB1r de roedores, 84% em anfíbios e 72% em peixes são idênticos à proteína do CB1r dos humanos (FASANO et al., 2009). Esse “rastros” evolutivo é uma forte evidência de que esse sistema é essencial, participando do desenvolvimento embrionário, crescimento axonal, regulação energética, consolidação de memória e aprendizagem e da modulação de respostas comportamentais (ALICZKI et al., 2015; CHEVALEYRE;

TAKAHASHI; CASTILLO, 2006; LAM; RASTEGAR; STRÄHLE, 2006; PETERS; CHEER; TONINI, 2021; ROHLER et al., 2016; SORIA-GOMEZ et al., 2017). No entanto, apesar das inúmeras evidências que apontem o SEC como protagonista na modulação do SNC, nem todos os mecanismos subjacentes da ação desse sistema estão totalmente elucidados.

1.3. SISTEMA ENDOCANABINÓIDE E O COMPORTAMENTO AGRESSIVO

As bases neuroanatômicas do comportamento agressivo, como descritos anteriormente, envolvem o córtex frontal/pré-frontal e o sistema límbico (FLANIGAN; RUSSO, 2019; NARVAES; DE ALMEIDA, 2014; TAKAHASHI et al., 2018). Em um nível neurofisiológico e neuroquímico, a agressão envolve múltiplos sistemas de neurotransmissão, como: a serotonina (5-HT), Glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA), dopamina, adrenalina e noradrenalina (MICZEK et al., 2007). Além disso, alguns peptídeos também estão envolvidos na expressão desse comportamento, por exemplo: fator liberador de corticotrofina, vasopressina/vasotossina, neuropeptídeo Y, peptídeos opioidérgicos; enzimas óxido nítrico sintase neuronal e endotelial, monoaminoxidase A (MAO-A); eixo hipotalâmico pituitário-adrenal (HPA) que faz parte do sistema neuroendócrino; mediadores endocanabinóides e seus receptores (LARSON; O'MALLEY; MELLONI, 2006; MICZEK et al., 2007; NARVAES; DE ALMEIDA, 2014; TAKAHASHI et al., 2018). Fatores genéticos também desempenham um papel fundamental na agressão, vários estudos identificaram que deficiências nos genes do triptofano hidroxilase 2 (TPH2), monoaminoxidase-A (MAO-A), transportador de 5-hidroxitriptamina (5-HTT) e dos receptores CB1, aumentam a probabilidade de ações impulsivas, violentas e hostis do indivíduo (DE BOER et al., 2015; ORR et al., 2021; RODRIGUEZ-ARIAS et al., 2013). Dessa forma, todos estes constituintes parecem atuar de forma conjunta na modulação do comportamento agressivo na maioria dos animais, enfatizando a importância dos estudos da agressão e da sua fisiopatologia através da pesquisa biomédica e translacional.

Nesse contexto, como abordado anteriormente, o sistema serotoninérgico possui grande participação na neurobiologia do comportamento agressivo (DE BOER et al., 2015). Estudos mostram que os Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina (ISRSs) reduzem a agressão impulsiva em indivíduos saudáveis com altos escores de agressão (PAUFF; MILLER, 2012). No entanto, essas abordagens farmacológicas ainda são

desafiadoras e esses tratamentos com alvo nesse sistema – tido como principal regulador da agressão - tem demonstrado eficácia limitada devido as reações adversas, a exemplo da inibição da atividade locomotora, sedação, ações estereotipadas e redução da interação social dos indivíduos, e essas problemáticas precisam ser contornadas (DE BOER et al., 2015). Nesse cenário, a relação entre SEC e agressão ganhou força após os pesquisadores observarem que administração de THC em situações estressantes poderia causar ou exacerbar o fenótipo tipo-agressivo em ratos, apesar de seu efeito ser sedativo em regra (MILLER; IPEKU; OBERBARNSCHEIDT, 2020; NAVARRETE et al., 2020). Também foi demonstrado que os efeitos do endocanabinóide AEA dependem da dose empregada; doses altas reduzem a agressão em camundongos agressivos, enquanto doses baixas aumentam as respostas agressivas em camundongos tímidos (ALICZKI et al., 2015; REY et al., 2012). Outros estudos reforçam a ideia de que o SEC é um importante modulador endógeno de controle do estresse, participando do controle do eixo HPA e interação com o sistema serotoninérgico, tendo potencial para contornar as limitações observadas nos tratamentos existentes (FOWLER, 2021; STEARDO et al., 2021).

Em outros relatos recentes, pesquisadores observaram que CBD exerce efeitos promissores sobre o SEC, devido sua ação indireta sobre o metabolismo (síntese e degradação) dos endocanabinóides AEA e 2-AG (ROHLEDER et al., 2016). Além disso, esse fitocanabinóide possui baixa seletividade ao CB1r, sendo associado a uma regulação tônica/constitutiva nos neurônios 5-HT o que pode desencadear efeitos imprevisíveis, em alguns casos (HARTMANN et al., 2019; ROHLEDER et al., 2016). Dessa forma, apesar do CBD ser o fitocanabinoide mais utilizado, com alta confiabilidade em seu uso medicinal, a busca por um medicamento com efeito anti-agressivo ainda está em aberto. Nesse caso, os pesquisadores têm buscado drogas com alta seletividade, que não causem alterações psicomotoras e que sejam utilizadas nas diversas patologias que expressem o fenótipo agressivo. Para o desenvolvimento desses estudos, a escolha de um modelo animal viável, de fácil manipulação farmacológica e que apresentem comportamentos agressivos bem definidos é essencial.

1.4. ESTADO REDOX E O COMPORTAMENTO AGRESSIVO

O estado redox é definido como o equilíbrio entre agentes antioxidantes e pro-oxidantes, essa dinâmica compensatória tem o objetivo de manter a funcionalidade da célula, garantindo o organismo mais próximo da homeostase (SIES, 2015). Em muitas vezes é assumido que comportamentos complexos exigem alta demanda energética - a exemplo do comportamento agressivo – e por consequência é observado o aumento de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO's) e esses metabólitos, em excesso, podem desencadear fortes respostas imunológicas em decorrência da ativação de citocinas pró-inflamatórias (ISAKSSON et al., 2011; NEUMANN; VEENEMA; BEIDERBECK, 2010; PATKI et al., 2015). Esse desequilíbrio redox induz estresse oxidativo em tecidos vulneráveis como o cérebro, gerando a peroxidação dos lipídeos de membrana, o que produz danos graves ou irreversíveis no tecido cerebral (GALLELLI et al., 2018). Por isso, os comportamentos agressivos exacerbados podem gerar respostas imunológicas descontroladas, dada as suas sequelas, é presumível que esses comportamentos em humanos desencadeie um desequilíbrio redox prejudicial para o funcionamento celular (MENTESANA; ADREANI, 2021; WANG et al., 2021). Reforçando essa ideia, Sloman e colaboradores observaram que comportamentos agressivos podem influenciar ou ser influenciados pelo estado redox cerebral (MENTESANA; ADREANI, 2021; SIES, 2015; SLOMAN et al., 2000). Nesse sentido, é importante “dissecar” os principais sistemas neuroquímicos envolvidos e potenciais alvos terapêuticos que atuem nessa dinâmica e mitiguem os danos celulares e comportamentais atrelados a essas desordens.

Por isso, a correlação entre estresse oxidativo e o comportamento agressivo precisa de mais investigações. Vários estudos já demonstraram que situações estressantes desencadeiam a liberação de citocinas pró-inflamatórias, associando esse viés inflamatório com alterações comportamentais como a ansiedade, agressividade e impulsividade (COCCARO; LEE; GOZAL, 2016; PATKI et al., 2015). Além disso, em doenças neurológicas é observado um claro desbalanço redox devido as várias disfunções ou mortes celulares, concomitante a uma resposta imunológica exacerbada junto ao aumento das ERO's (BJØRKLUND et al., 2020; MENTESANA; ADREANI, 2021; TANAKA; VÉCSEI, 2020; WANG et al., 2021). Esses acontecimentos são considerados por muitos pesquisadores como um “*start*” para sucessivos eventos neuroquímicos que culminam em comportamentos patológicos, dentre eles a agressão (CAHILL-SMITH; LI, 2014; GU; CHAUHAN; CHAUHAN, 2015). Nesse sentido, as pesquisas biomédicas têm direcionado

estudos em modelos animais para investigar a correlação entre o estresse oxidativo e o comportamento. Esses estudos demonstraram que fármacos com efeitos antioxidantes reduzem comportamentos tipo-ansiedade, ações agressivas e impulsivas, prevenindo danos teciduais causados pelo estresse oxidativo no cérebro (ALICZKI et al., 2015; HARTMANN et al., 2019; ORR et al., 2021; RODRIGUEZ-ARIAS et al., 2013; ROHLEDER et al., 2016).

Nesse contexto, o SEC demonstrou ser alvo interessante na modulação redox do cérebro. Palomba e colaboradores demonstraram *in vitro* que a ativação do CB1r por ACEA preveniu o estresse oxidativo em células hipotalâmicas (PALOMBA et al., 2015), assim como uso do CBD também demonstrou efeito antioxidantes em cultura de célula (KIM et al., 2021). Em estudos *in vivo*, foi demonstrado a ativação do CB1r reduziu comportamentos tipo-ansiedade e atenuou os níveis de estresse oxidativo em animais que passaram por estresse agudo (LUZ et al., 2021). Esses relatos da literatura demonstram que o SEC participa da modulação comportamental como extensivamente relatado anteriormente, além de desempenhar um papel neuroprotetor (GALLELLI et al., 2018; PALOCZI et al., 2018). Portanto, o SEC é um forte candidato para o tratamento de comorbidades que apresentem episódios agressivos desordenados, podendo agir através do seu potencial antioxidante e anti-agressivo.

1.5. O ZEBRAFISH COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DO COMPORTAMENTO TIPO-AGRESSIVO

O *Danio rerio* (Zebrafish) é um teleósteo nativo de habitats de água doce no sul da Ásia, no seu ambiente natural vivem em grupos com estrutura hierárquica bem definida e estável (TELES; OLIVEIRA, 2016). Embora a maior parte das pesquisas biomédicas com animais até o momento, consista em experimentos usando modelos roedores, o zebrafish recentemente ganhou força como um poderoso modelo para investigar os mecanismos fisiológicos de diversas patologias (BEST; ALDERTON, 2008; WANG; CAO, 2021). Essas possibilidades translacionais estão baseadas nas semelhanças neuroquímicas, genéticas e hormonais altamente conservados em comparação aos mamíferos, com aproximadamente 71% de genes ortólogos (BUSSE et al., 2020) .



Figura 3: *Danio rerio* (zebrafish), linhagem *Short-finn* (dreamstime.com)

Em espécies gregárias, como o zebrafish, acredita-se que comportamentos agressivos são recursos chaves aos indivíduos para ganhar e/ou manter um *status* social elevado, ou seja, a posição hierarquia (dominação ou subordinação) tem implicações na aptidão e na saúde geral do indivíduo (FOX et al., 1997; PAULL et al., 2010; SAPOLSKY, 2005). Sabe-se, ainda, que o zebrafish possui sistemas de neurotransmissão primários, como: serotoninérgico, dopaminérgico, GABAérgico, purinérgico, catecolaminérgico, nitrérgico, colinérgico, entre outros (RICO et al., 2011). Além de possuir sistemas neurais conservados, o telencéfalo do zebrafish adulto possui duas subdivisões principais: o telencéfalo dorsal (pálio) e o telencéfalo ventral (subpálio) (figura 4). O telencéfalo dorsal é constituído por vários núcleos neurais: Pálio medial (DM) correspondente a amígdala mamífera e o córtex periforme; Pálio dorsal (Dd) que corresponde ao isocortex de mamífero; Pálio lateral (Dl) que é homólogo ao hipocampo de mamífero; Pálio central (Dc); Pálio posterior (Dp). O telencéfalo ventral (subpálio) é subdividido em quatro núcleos principais: Subpálio ventral (Vv); Subpálio dorsal (Vd), Subpálio central (Vc) e Subpálio lateral (Vl). Essas divisões cerebrais com homologias ao SNC de mamíferos evidencia um forte requisito para utilização do modelo animal no estudo translacional de neuropatologias (MUELLER et al., 2011).

O SEC foi descrito no zebrafish com características funcionais e moleculares semelhantes à de mamíferos. Krug e colaboradores realizaram um mapeamento completo de todos os genes, proteínas e enzimas que compõem o SEC no modelo animal (KRUG; CLARK, 2015). Este estudo mostrou que a expressão do CB1rs no SNC embrionário e adulto, sendo expressos, principalmente, no Bulbo Olfatório (BO), Telencéfalo Dorsal (TD); Telencéfalo Ventral (TV); Núcleos Habênuclares (NH); Tecto Óptico (TeO); Ventrículo Tectal (VT); Núcleo Supraquiasmático (NS); Núcleo Teniae (NT); Núcleos Hipotalâmicos (HP); Tractus Tectobulbaris (TT); Formação Reticular (FR) (Figura 4) (DEMIN et al., 2018; KRUG; CLARK, 2015; LAM; RASTEGAR; STRÄHLE, 2006).

Notavelmente, altos níveis de expressão do CB1r no telencéfalo dorso medial (DM), homólogo ao sistema límbico, indicam intrinsecamente seu envolvimento na modulação de processos cognitivos e comportamentais (DEMIN et al., 2018). Outras evidências apontam que a co-expressão de CB1r e neurônios dopaminérgicos no hipotálamo, representa um núcleo importante para o controle e execução de movimentos (LAM; RASTEGAR; STRÄHLE, 2006). Destaca-se, ainda, a localização dessas proteínas na matriz ventricular proliferativa sugerindo que a expressão desse receptor está relacionada com a neurogênese (KRUG; CLARK, 2015). Além dessa ampla distribuição no encéfalo, similarmente ao observado nos mamíferos, os pesquisadores investigaram as semelhanças moleculares e estruturais do CB1r. Demin e colaboradores observaram que os resíduos de aminoácidos críticos que caracterizam o CB1r estão conservados, estando em conformidade com a matriz de funcionalidade descrito por McPartland e Glass (2003), essas evidências suportam que o CB1r do zebrafish é um homólogo funcional do CB1r de humanos (DEMIN et al., 2018; MCPARTLAND; GLASS, 2003).

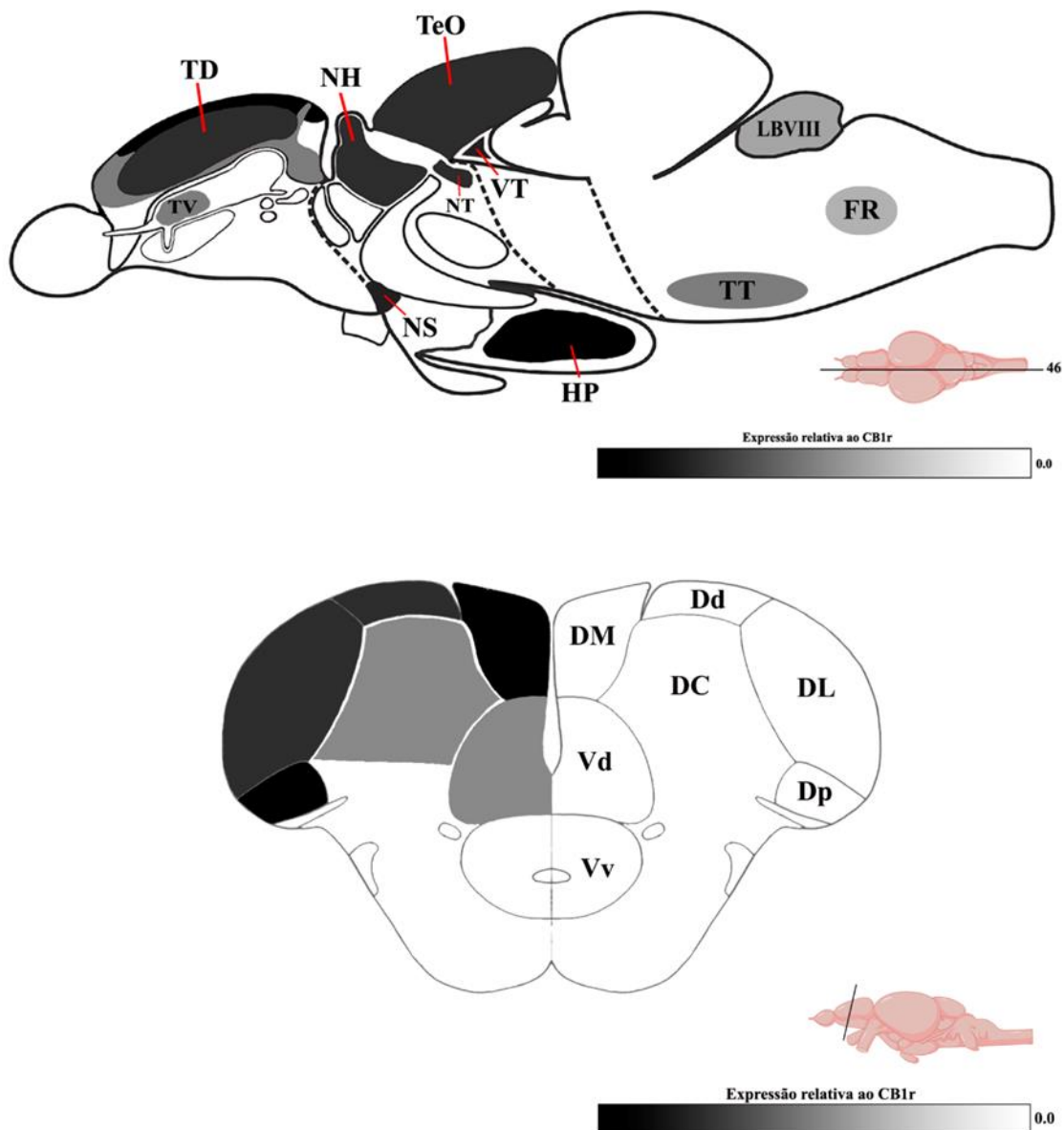


Figura 4: Distribuição anatômica do CB1r no encéfalo do *Danio rerio*, representado pela distribuição em escala de densidade. Corte sagital do encéfalo (A) O Telencéfalo Dorsal (TD); Telencéfalo Ventral (TV); Núcleos Habênuclares (NH); Tecto Óptico (TeO); Ventrículo Tectal (VT); Núcleo Supraquiasmático (NS); Núcleo Teniae (NT); Núcleos Hipotalâmicos (HP); Tractus Tectobulbaris (TT); Formação Reticular (FR); Corte coronal do encéfalo (B) Pálio Medial (DM) correspondem a amígdala mamífera e o córtex periforme; Pálio Dorsal (Dd) corresponde ao isocórtex de mamífero; Pálio Lateral (DL) é homólogo ao hipocampo de mamífero; Pálio Central (DC); Pálio Posterior (Dp); Sub-pálio ventro dorsal (Vd). (figura: Autor; Adaptado: MUELLER et al., 2011).

Em geral, essas informações suportam que esse modelo animal é uma ferramenta promissora para estudar o papel do sistema endocanabinóide na modulação de comportamentos, devido sua homologia funcional em comparação aos vertebrados superiores (DEMIN et al., 2018). Embora os roedores tenham sido bastantes utilizados neste campo, as dificuldades metodológicas, logísticas e fiscais em mimetizar o ambiente natural da espécie, expressões limitadas do comportamento agressivo, aliado com a sensibilidade a distúrbios ambientais como luz, som, temperatura e odores torna o uso desse modelo animal limitado (VAN MEER; RABER, 2005). Em contrapartida, outras espécies de vertebrados podem ser utilizadas (com logística menos elaborada) - a exemplo do zebrafish - que tem sido bastante utilizado devido suas vantagens em função de seu tamanho relativamente pequeno, fácil manipulação, tempo de geração curto e início precoce de exposições de comportamentos sociais (DREOSTI et al., 2015; OLIVEIRA; SILVA; SIMÕES, 2011; PANDOLFI; SCAIA; FERNANDEZ, 2021).

Outra vantagem atribuída ao modelo do zebrafish é uma matriz comportamental bem definida que se repete ao longo do tempo (WAY et al., 2015). Nesta espécie, o comportamento tipo-agressivo pode ser avaliado durante as lutas agonísticas, resultando em uma estrutura hierárquica baseada em dominância. Essa estrutura social é constituída por um indivíduo dominante e um subordinado, esse *status* é definido como consequência de uma assimetria na expressão dos parâmetros: *Atacar*, *Morder*, *Perseguir*, *Recuar*, *Fugir* e *Congelar* (OLIVEIRA; SILVA; SIMÕES, 2011; TELES; OLIVEIRA, 2016). Essa interação social tem base altamente estruturada, não aleatória e com mecanismo regulatório propenso à manipulação farmacológica, sendo ideal para o estudar o comportamento e a função cerebral (OLIVEIRA; SILVA; SIMÕES, 2011). Todas essas informações, considerando que os comportamentos sociais são filogeneticamente conservados na maioria das espécies, torna o zebrafish um modelo de interesse no estudo do comportamento agressivo. Apesar de sua relevância biológica e dos inúmeros estudos na literatura dedicada ao comportamento agressivo, nem todos os mecanismos genéticos, fisiológicos e hormonais estão elucidados (TAKAHASHI et al., 2018).

Nesse sentido, o modelo animal proposto para essa investigação, baseado na literatura, possui inúmeros requisitos que permitem seu uso para pesquisas translacionais (DEMIN et al., 2018; MÜLLER et al., 2020; WANG; UEDA, 2009). Assim, este estudo pretende avaliar a participação do receptor canabinóide tipo 1 (CB1r) na modulação do estado redox cerebral e no comportamento tipo-agressivo em *Danio rerio* (zebrafish).

2. OBJETIVO

2.1.OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo geral avaliar a participação do receptor canabinóide tipo 1 (CB1r) no estado redox cerebral e no comportamento do tipo-agressivo em *Danio rerio* (zebrafish).

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os parâmetros agressivos-defensivos dos sujeitos após o isolamento social.
- Avaliar o efeito do tratamento com agonista o ACEA e com antagonista AM-251 do CB1r sobre os comportamentos tipo agressivo-defensivo do zebrafish.
- Avaliar o estado redox cerebral dos indivíduos dominantes e subordinados tratados com ACEA e AM-251.

3. METODOLOGIA

3.1. ANIMAIS E ALOJAMENTO

Neste estudo foram utilizados 68 peixes da espécie *Danio rerio* (zebrafish) da linhagem *short-finn* com peso médio de 0,3 g ($\pm 0,2$) de ambos os sexos (50:50), adquiridos de um fornecedor local (Belém – PA). Os animais foram mantidos em tanques de 4 L (n = 8 por tanque) com sistema de filtragem mecânica, química e biológica, armazenados em prateleira Techplast, sob condições estáveis com ciclo claro/escuro (14h/10h), temperatura ($28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$), pH $7 \pm 0,2$ e condutividade de 586 S, alimentados uma vez ao dia com ração comercial floculada (Tetra, Alemanha).

3.2. DROGAS E REAGENTES

Foram utilizados o agonista seletivo do receptor canabinóide tipo 1 (CB1r): (Arachidonyl-20-chloroethylamide hydrate (**ACEA**), 97% de pureza; CAS: 220556-69-4) e o antagonista seletivo do CB1r: (N-(piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (**AM-251**), 98% de pureza; CAS:183232-66-8) ambos adquiridos de Sigma Aldrich - São Paulo. Para os ensaios de quantificação da peroxidação lipídica foram utilizados os seguintes reagentes: (N-metilfenilindol, ácido metanossulfônico e malondialdeído) e para a quantificação dos níveis de tiol não proteico foram utilizados: [5,50-Ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) e N-acetilcisteína] ambos adquiridos da Sigma Aldrich (Brasil) de grau analítico.

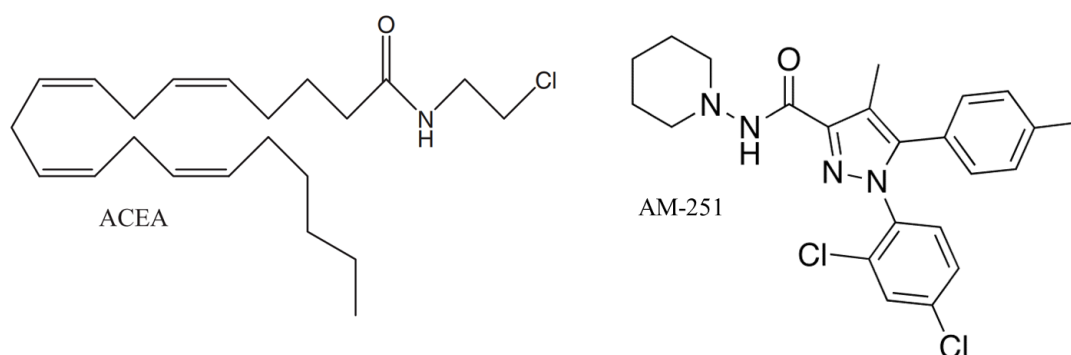


Figura 5: Estrutura molecular dos canabinóides sintéticos (HILLARD et al., 1999)

3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para a análise do comportamento, antes das lutas, os sujeitos foram transportados dos tanques residentes e isolados aos pares, todos padronizados quanto ao peso e tamanho. Para o isolamento, os animais foram colocados em aquários com uma barreira física opaca fixada no meio do aparato para garantir o isolamento físico, mas não químico. Depois de 24 h de isolamento os animais foram pré-tratados via intra-abdominal (i.a) com as drogas de interesse, após 30 minutos da farmacocinética as barreiras foram removidas e as interações sociais tiveram duração de 30 minutos conforme descrito nos estudos de Oliveira et al., (2011). Foram filmados apenas os cinco minutos iniciais e finais e os parâmetros *atacar*, *morder*, *perseguir*, *recuar*, *fugir e congelar* foram quantificados pelo número de ocorrências, conforme descrito na tabela 1. Para análises dos vídeos, inicialmente, os indivíduos foram identificados por características morfológicas (por exemplo, intensidade das listras laterais do corpo e anatomia das nadadeiras caudais). Os vídeos foram analisados através do Software VLC Media Player e, quando foi necessário, o recurso de câmera lenta foi utilizado para identificar comportamentos rápidos e sucessivos e quando esses parâmetros não foram identificados, foram desconsiderados para a análise. Os indivíduos que apresentaram maior frequência de atos agressivos (Ataque, mordida e perseguição) ou maior índice de exploração do aparato de teste foram considerados dominantes.

3.4 GRUPOS E TRATAMENTOS

Os animais foram divididos aleatoriamente nos seguintes grupos: (a) Controle (n = 26 animais); (b) ACEA (n = 30 animais); (c) AM-251 (n = 12 animais). Os sujeitos foram crioadestesiados e os fármacos aplicados com seringa Hamilton® via intra-abdominal: (a) Veículo (NaCl 0,9%); (b) agonista ACEA 1 mg/kg; (c) antagonista o AM-251 1 mg/kg. As drogas foram diluídas em Salina e com concentração final de 0,05% de DMSO baseados nos trabalhos de Rodriguez-Arias et al., 2013 e Rodgers et al., 2005, respectivamente. Para os ensaios bioquímicos foram utilizados (n = 10 animais para o grupo controle; n = 10 para o grupo ACEA; n = 10 para o grupo AM-251).

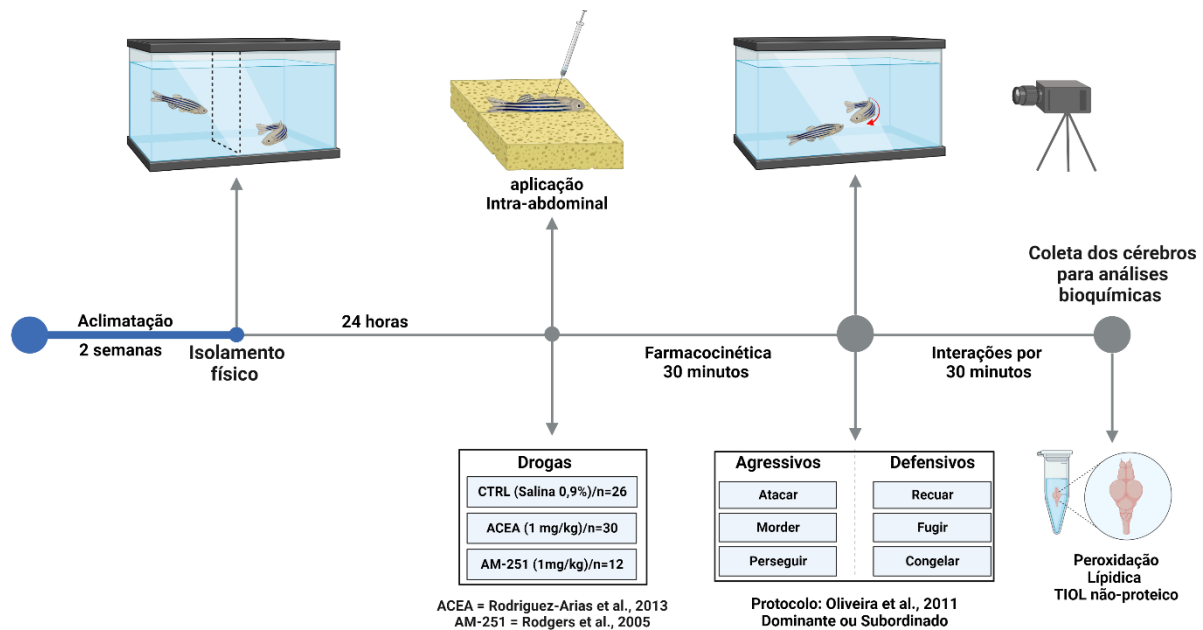


Figura 6: Cronograma dos experimentos comportamentais. Aclimação, isolamento por 24 h, aplicações farmacológicas, testes comportamentais e coleta dos cérebro para ensaios bioquímicos. (Figura: Auto; Ilustração produzida em BioRender.com)

Tabela 1: Parâmetros comportamentais ofensivos e defensivos observados durante interações sociais em zebrafish. (adaptado: Oliveira et al., 2011)

Comportamento	Descrição
Ataque	O indivíduo nada rapidamente em direção ao oponente, mas não ocorre nenhum contato físico entre eles.
Morder	O indivíduo abre e fecha a boca em contato com a superfície corporal do oponente, geralmente perto das partes mais ventral ou posterior do corpo.
Perseguir	Semelhante ao comportamento de Ataque, mas com uma perseguição direta e ativa pelo agressor em direção ao oponente.
Recuar	O peixe nada rapidamente para longe do adversário em resposta a um Ataque ou uma mordida.
Fugir	Reação de fuga contínua em resposta a uma perseguição. Os peixes nadam rapidamente para longe do agressor.
Congelar	O sujeito permanece imóvel com as aletas retraídas perto da parte inferior ou perto da superfície do aquário e com a região caudal voltada para baixo.

3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.5.1 Peroxidação lipídica

Este método consiste na quantificação dos produtos moleculares causados pelo estresse oxidativo, permitindo inferir de forma indireta os níveis de peroxidação lipídica em um tecido, utilizando o método colorimétrico descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990). Para essa quantificação indireta, obtém-se um cromóforo estável a partir da reação do n-metil-2-fenilindol (NMFI) com o ácido metanossulfônico na presença dos produtos da peroxidação lipídica, a exemplo do malondialdeído (MDA). Primeiramente, após avaliação comportamental, os animais foram crioadestesiados e rapidamente decapitados e seus cérebros removidos e armazenados em micro tubos contendo 300 µL de Tampão TRIS-HCl e congelados a -80 °C até o momento da análise. Estas amostras foram descongeladas, sonicadas e um volume de 50 µL foi coletado para quantificação de proteínas pelo método de Bradford. O restante do homogenato foi centrifugado a 5600 rpm a 4 °C por 10 minutos e após a centrifugação, 80 µL do sobrenadante foi coletado e adicionado em micro tubos contendo NMFI e ácido metanossulfônico, os quais foram mantidos em banho maria por 40 minutos para reação. Após o tempo de reação, as amostras foram pipetadas em microplacas de 96 poços, em triplicata, e lidas no espectrofotômetro a 570 nm. Dados brutos: Dominante = $36,688 \pm 5,410$ nmol/mg ptn; Subordinando = $35,511 \pm 8,504$ nmol/mg ptn).

3.5.2 Ensaio de Tiol Não Proteico (NPSH)

Este método consiste na quantificação de moléculas que contém o grupo sulfidril em sua estrutura. Dessa forma, é possível inferir o estado redox e a capacidade redutora do tecido fisiológico de forma proporcional a concentração dos níveis de sulfidril no sistema. Para isso, utilizamos o protocolo adaptado de Marcon et al., 2018: O procedimento para coleta dos cérebros é o mesmo utilizado para análise da peroxidação lipídica. Desse modo, um volume igual de ácido tricloroacético a 6% foi adicionado a cada amostra, que foi subsequentemente centrifugada a 3.000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi recolhido e adicionado a 1 M de tampão TFK (26 mM KH₂PO₄, 25 mM K₂HPO₄, pH 7,2) para reagir durante 15 min com 10 mM de ácido 5,5-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB). A análise de NPSH subsequente foi baseada na curva padrão da N-acetilcisteína, medida pela sua absorbância em 406 nm, sendo corrigidos pelos níveis de proteína determinados pelo método de Bradford. Dados brutos: Dominante= $4,668 \pm 0,642$ µmol/mg ptn; Subordinado = $5,431 \pm 0,411$ µmol/mg ptn).

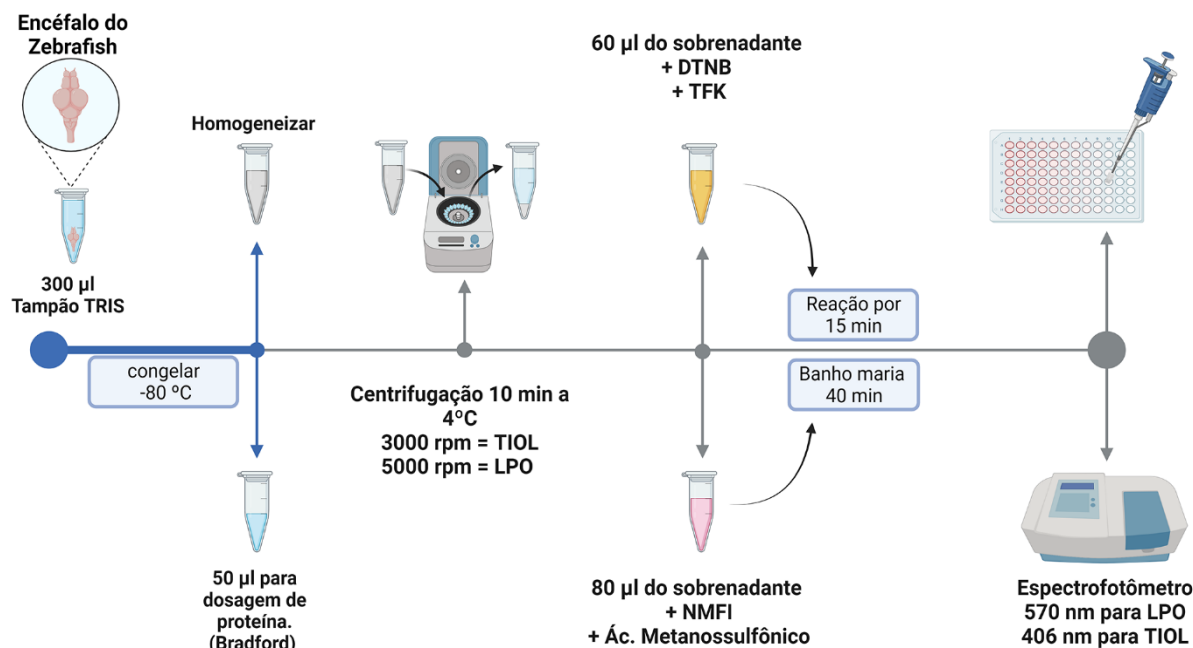


Figura 7: Desenho experimental dos ensaios bioquímicos para quantificar os níveis de peroxidação lipídica e os níveis de tióis não proteico, adaptado do protocolo de Marcon et al., 2018. (Figura: Auto; Ilustração produzida em BioRender.com)

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram apresentados como média e padrão de erro médio (S.E.M) para os dados comportamentais e porcentagem do controle para os dados bioquímicos. A distribuição normal dos dados foi determinada pelo teste de Shapiro-Wilk. A análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida do teste *post hoc* de Tukey foi aplicada para os dados bioquímicos (Fator 1: tratamento [Controle, ACEA ou AM-251] e Fator 2: sujeitos [dominantes ou subordinados]). Para dados comportamentais foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn para múltiplas comparações. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism versão 9.3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), considerando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 A ATIVAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS CB1rs MODULA O COMPORTAMENTO TIPO-AGRESSIVO EM ZEBRAFISH.

Nossos resultados mostram no grupo controle uma organização hierárquica baseada em dominância bem estabelecida. Conforme observado na figura 8A-C, no grupo controle os sujeitos caracterizados como dominantes realizaram um maior número de ataques, mordidas e perseguições em relação aos indivíduos subordinados. Por outro lado, as médias de recuo e fuga aumentaram significativamente nos animais subordinados em relação aos animais dominantes (Figura 8D-E) resultados que estão em consonâncias com os parâmetros agressivos, a frequência de congelamentos não diferiu entre os sujeitos (Figura 8F) e esse padrão hierárquico está de acordo com a literatura.

Nossos dados também mostraram, pela primeira vez, que no grupo tratado com o ACEA, agonista seletivo do CB1r, tiveram uma diminuição substancial na frequências médias de ataque e mordida entre sujeitos dominantes e subordinados (Figura 8A-B) e esse efeito não foi observado nas ações do tipo perseguição. O tratamento com antagonista AM-251, seletivo do CB1r, não gerou efeito significativo em quaisquer parâmetros do tipo-agressivo e na organização hierárquica em comparação ao controle, conforme mostrado na figura 8A-F.

Na comparação entre os grupos, observamos que os sujeitos dominantes previamente tratados com o agonista ACEA tiveram uma diminuição substancial nos parâmetros agressivos de ataques e mordidas em comparação aos sujeitos dominantes dos grupos controle e AM-251 (Figura 8A-B). Este fenômeno não foi observado nas ações de perseguição entre sujeitos dominantes do grupo ACEA em relação aos dominantes dos grupos controle e AM-251 (Figura 8C). Todos os dados comportamentais estão disponíveis no anexo 1.

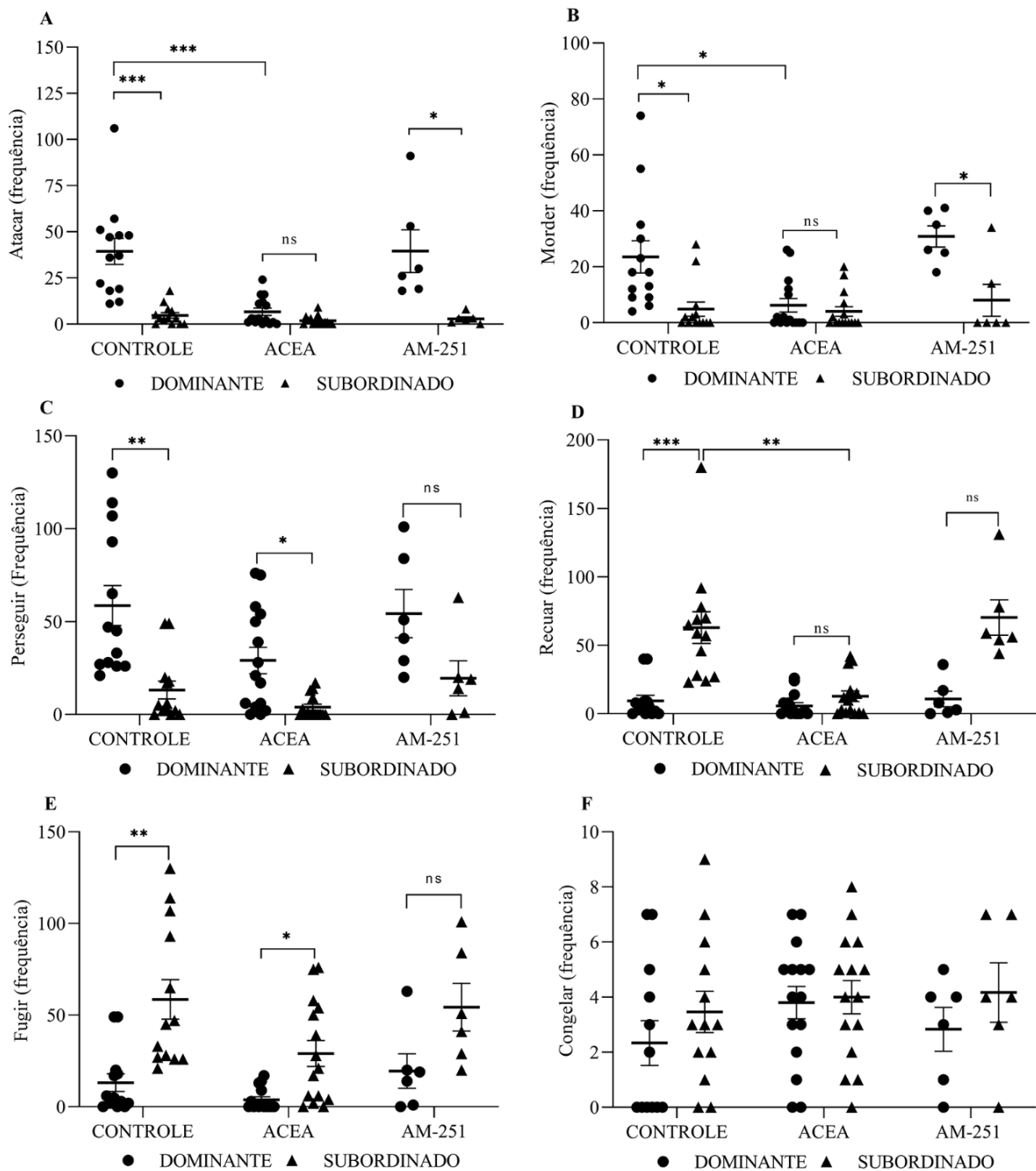


Figura 8: Quantificação dos comportamentos agressivos e defensivos durante os cinco minutos iniciais e finais do experimento: grupos CTRL (N: 26), ACEA (N: 30) e AM-251 (N: 12). Os parâmetros (A) Atacar. (B) morder. (C) Perseguir. (D) Recuar. (E) Fugir e (F) congelar, foram quantificados pelo número de ocorrências. Os dados são apresentados como média ± S.E.M., considerando $p < 0,05$. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste pós teste de Dunn para múltiplas comparações. *** $<0,0001$; ** $<0,001$; * $\leq 0,05$.

3.1 – A ATIVAÇÃO DOS CB1rs MODULA O COMPORTAMENTO TIPO-AGRESSIVO ATRAVÉS DE UMA VIA REDOX-INDEPENDENTE.

Para avaliarmos se o estado redox cerebral é determinante para a diminuição do comportamento tipo-agressivo mediado por CB1r, o estresse oxidativo foi avaliado usando ensaios de peroxidação lipídica e níveis tióis não proteicos. Nossos dados não mostram diferença entre os sujeitos dominante e subordinado do grupo controle nos níveis cerebrais de MDA ou NPSH, sugerindo que o estresse oxidativo não é determinante para o estabelecimento da hierarquia social em zebrafish (Figura 9A-B).

Enquanto os grupos ACEA e AM-251 tiveram efeitos diferentes nos parâmetros comportamentais, ambos os grupos apresentaram os mesmos níveis de estresse oxidativo cerebral para ambos os sujeitos. Assim, o grupo ACEA apresentou redução de aproximadamente 40% nos níveis de MDA nos sujeitos dominantes e subordinados em relação ao grupo controle e curiosamente o mesmo efeito foi observado no grupo AM-251 (Figura 9A).

Além disso, nos grupos ACEA e AM-251 houve um aumento aproximado de 45% nos níveis de tióis não proteicos no cérebro dos animais dominantes em relação ao controle dominante. (Figura 9B). Porém, nenhum efeito significativo foi observado nos níveis de NPSH nos cérebros de animais subordinados em comparação ao controle (Figura 9B). Todos os dados bioquímicos estão disponíveis na tabela 3.

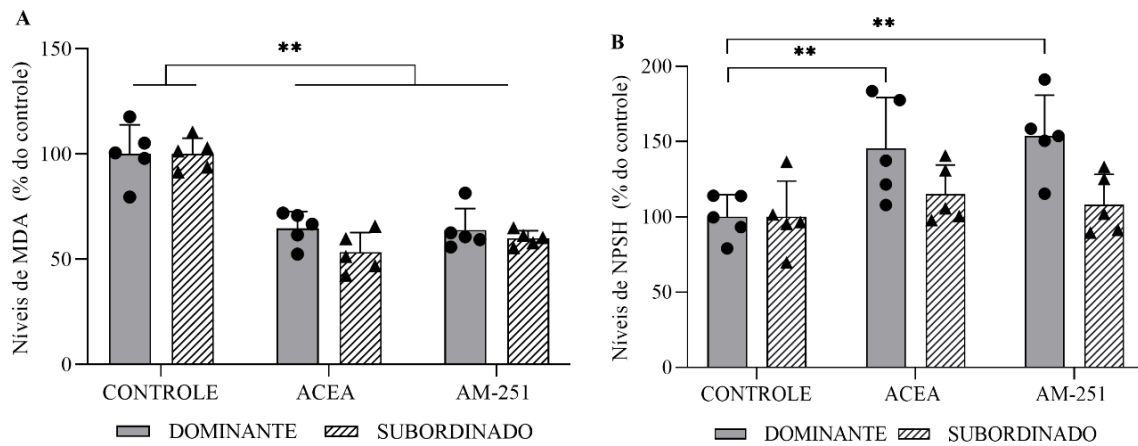


Figura 9. Efeito da ativação de CB1r nos níveis de peroxidação lipídica (A) e NPSH (B) no cérebro de Zebrafish submetidos a interações sociais. Os valores são expressos como porcentagem do Controle $\pm$ erro padrão. Utilizou-se o teste de análise de variância de duas vias (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey, grupos CTRL (n: 10), ACEA (n: 10) e AM-251 (n: 10); considerando $p < 0,05$; ** $< 0,001$; * $\leq 0,05$.

DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que a ativação do CB1r modula o comportamento do tipo-agressivo e por consequente o estabelecimento da hierarquia social do zebrafish, por um mecanismo redox-independente. Nesse contexto, inúmeros estudos já atestaram que o isolamento social seguido das interações agonísticas em zebrafish, resulta na organização social hierárquica baseada em dominância, decorrente de uma clara assimetria na expressão de comportamentos entre os sujeitos dominantes e subordinados (DE ABREU et al., 2019). Oliveira e colaboradores observaram, utilizando este modelo animal como sistema de estudo, um comportamento do tipo-agressivo complexo e altamente estruturado e não aleatório (OLIVEIRA; SILVA; SIMÕES, 2011). Esta premissa é fundamental, pois torna os comportamentos sociais nesta espécie adequado para análises farmacológicas e quantitativas, permitindo investigar o substrato neuronal envolvido na resolução dos conflitos sociais. Por isso, baseado em estudos com modelos de roedores, formulamos a hipótese que o Sistema Endocanabinóide pode modular a resolução dos conflitos sociais em diferentes espécies.

Ao avaliarmos esses parâmetros em nosso trabalho, observamos que o grupo controle apresentou uma estrutura hierarquia bem definida e estável, semelhante aos relatos da literatura (OLIVEIRA; SILVA; SIMÕES, 2011). Nesse caso, os sujeitos dominantes apresentaram maior frequência de ações agressivas como ataques, mordidas e perseguições, enquanto os subordinados expressaram maior número de comportamentos defensivos como recuar e fugir. Esse padrão comportamental faz-se necessário para manter a homeostase social, impedindo que os conflitos de co-específicos perdurem por longos períodos e ponham em risco a saúde geral dos sujeitos (WATANABE; YAMAMOTO, 2015). Em contrapartida, nossos resultados mostraram que a ativação do CB1r pelo agonista ACEA, interferiu no pleno estabelecimento da hierarquia social e na relação dominante/subordinado durante as lutas sociais. Esse fenômeno é o resultado da diminuição significativa na frequência dos parâmetros de ataques e mordidas, exibidos pelos sujeitos dominantes em comparação aos indivíduos subordinados no grupo ACEA. Watanabe e colaboradores reforçam que comportamentos agressivos são recursos chaves para a definição das lutas, e quaisquer alterações na expressão desses comportamentos pode significar ausência ou instabilidade da hierarquia social (WATANABE; YAMAMOTO, 2015). Um achado semelhante foi relatado em camundongos, mostrando

que a ativação CB1r por ACEA diminuiu o comportamento agressivo exibido por animais residentes socialmente isolados (RODRIGUEZ-ARIAS et al., 2013).

Nossos resultados corroboram, também, com os estudos de Chang e colaboradores, no qual a ativação farmacológica de CB1rs pelos agonistas WIN-552122 e ACPA reduzem comportamentos tipo-agressivo como mordidas e ataques provocados por estresse agudo em camundongos socialmente isolados (CHANG et al., 2021). Este mesmo efeito foi mimetizado a partir do bloqueio de enzimas que degradam endocanabinóides (AEA e 2-AG), sendo que o aumento desses ligantes endógenos provocaram uma redução da agressão impulsiva nesses animais (CHANG et al., 2021). Em outro exemplo, Hosie e colaboradores utilizaram camundongos Neuroligin-3 (NL3^{R451C}) como modelo para estudar o transtorno do espectro autista. Estes pesquisadores observaram que ativação de CB1r pelo agonista WIN-552122 atenuou a expressão de comportamentos agressivos através da diminuição da atividade sináptica excitatórias em regiões como a amígdala basolateral, reforçando a possibilidade do SEC como alvo terapêutico para tratar comportamentos agressivos associada a neuropatologias (HOSIE et al., 2018).

Além disso, pela primeira vez, mostramos um efeito modulador do Sistema Endocanabinóide sobre comportamentos agressivos em zebrafish. Consistentemente, observamos que os sujeitos dominantes tratados com o ACEA expressaram menor frequência de ações de ataque e mordida em comparação aos sujeitos dominantes dos grupos controle e AM-251. Entretanto, a ativação do CB1r não exerceu efeito modulador sobre os comportamentos de perseguição e fuga, permitindo inferir que a hierarquia social no grupo ACEA foi estabelecida em algum nível. Este fato corrobora em parte com Stephen Orr e colaboradores que, descreveram que à medida que as relações sociais se estabelecem entre os sujeitos, os padrões de comportamento começam a mudar para refletir a posição social. Nesse caso, é observado um perfil de natação e fuga característico de cada sujeito segundo seu status social (ORR et al., 2021). Por isso, os dominantes tendem a explorar e perseguir os subordinados durante e após o estabelecimento da hierarquia, ganhando assim acesso exclusivo aos dois terços superiores do tanque experimental, por sua vez, indivíduos subordinados tendem a apresentar comportamentos de fuga contínua ou congelamentos, normalmente nas extremidades do aparato comportamental (MILLER et al., 2017). Este mesmo perfil comportamental foi observado em nossos grupos experimentais, reforçando nossa hipótese de que a hierarquia social foi estabelecida, apesar de uma mudança significativa no padrão de agressividade observado no grupo dominante ACEA.

Este fato é bastante relevante ao demonstrar que o SEC, através da ativação CB1r, exerce um efeito anti-agressivo sem comprometer a atividade locomotora dos sujeitos. Esse resultado é de grande interesse para esta área de investigação, pois os principais tratamentos utilizados atualmente, para esses fins, contam com moduladores do sistema serotoninérgicos, como mencionado na introdução, esses estudos indicam que a diminuição da agressividade está associada a déficits locomotores, baixa interatividade, comportamento estereotipados, respostas com maior latência a estímulos, entre outros (MICZEK et al., 2007). Por isso, nossos dados corroboram, em parte, com estudos de Hartmann e colaboradores que ao utilizarem o fitocanabinoide CBD observaram um efeito anti-agressivo em camundongos socialmente isolados, efeito não associado a déficits locomotores dos indivíduos (HARTMANN et al., 2019).

Neste mesmo estudo, os pesquisadores mostraram que a administração aguda do antagonista AM-251 não induziu nenhuma alteração comportamental em camundongos socialmente isolados (HARTMANN et al., 2019). Assim, um efeito semelhante foi observado em nosso estudo, no qual o bloqueio putativo de CB1r pelo AM-251 não influenciou o comportamento do tipo-agressivo em comparação ao grupo controle. Isso sugere que 1) o CB1r modula o comportamento agressivo através de uma ação fásica em vez de tônica, ou 2) os CB1r não são os únicos moduladores desse comportamento, e vários mecanismos compensatórios podem fornecer um controle homeostático de sua expressão.

De fato, o SEC interage com vários sistemas de neurotransmissão para evocar uma resposta fisiológica (SORIA-GOMEZ et al., 2017). No contexto da agressividade, a serotonina (5-HT) desempenha um papel significativo na expressão desse comportamento, pois os altos níveis extracelulares de 5-HT no cérebro estão associados uma baixa agressividade em roedores e teleósteos (NELSON; CHIAVEGATTO, 2001; THEODORIDI; TSALAFOUTA; PAVLIDIS, 2017). Por isso, a explicação mais racional para tal fenômeno foi relatado por Hartmann: A ativação do CB1r induz indiretamente liberação de serotonina, enquanto o bloqueio desse receptor pelo AM-251 não exerce efeito contrário, sugerindo uma ação fásica do CB1r sobre a expressão da agressividade (HARTMANN et al., 2019). Em nosso organismo modelo, os CB1r estão amplamente distribuídos no hipotálamo, habênula, telencéfalo dorso-medial (região homóloga à amígdala mamífera), telencéfalo lateral (homologo ao hipocampo mamífero), aliado com projeções de neurônios serotoninérgicos ao telencéfalo reforça a hipótese que o SEC desempenha um protagonismo na modulação de comportamentos sociais, como

extensivamente relatado em roedores (LAM; RASTEGAR; STRÄHLE, 2006). Portanto, mais estudos são necessários para melhor elucidar o papel do SEC na modulação da neuroquímica da agressividade, sendo o zebrafish um modelo animal ideal para esses fins.

Outro fator relevante nos estudos do comportamento agressivo é investigar as consequências fisiológicas nos indivíduos após episódios agressivos adaptativos ou patológicos. Nesse contexto, retomando a informação que comportamentos complexos exigem alta demanda energética, alguns estudos relatam que o aumento de ERO's podem atingir vários tecidos do organismo e o mais susceptível é o cérebro, devido sua vulnerabilidade e sua alta exigência metabólica (ISAKSSON et al., 2011). Por isso, o estresse oxidativo ganhou notoriedade e tem sido associado como causa ou consequência de inúmeros distúrbios comportamentais, como: ansiedade, depressão, agressividade, impulsividade (PATKI et al., 2013, 2015). Apesar do grande número de estudos nesta área de investigação, ainda não está claro como as ERO's podem desencadear comportamentos disruptivos. A hipótese mais aceita postula que essas moléculas pro-oxidantes geram fortes respostas imunológicas e esses eventos culminam em comportamentos patológicos e essa sucessão de eventos pode transformar-se em ciclo-dependente (LARSON; O'MALLEY; MELLONI, 2006; PATKI et al., 2015). Portanto, investigar quais os sistemas neuroquímicos e moleculares envolvidos nessa dinâmica é importante para desenvolver terapias eficazes.

Este fato nos fez formular nossa segunda hipótese: o estresse oxidativo implica no estabelecimento da hierarquia social e na relação dominante/subordinado? Nossos resultados sugerem que o estado redox cerebral do zebrafish não é um fator determinante para o estabelecimento de uma hierarquia social. Observamos, assim, que o grupo controle não apresentou diferença nos níveis de peroxidação lipídica entre dominantes e subordinados. Este resultado contrasta com alguns achados na literatura, Sapolsky e colaboradores, por exemplo, demonstraram que indivíduos subordinados apresentam altos níveis de estresse oxidativo cerebral e a longo prazo essas implicações prejudicam a saúde geral do indivíduo (SAPOLSKY, 2005). Em nosso estudo essa diferença redox não foi observada, ambos os sujeitos apresentaram níveis de estresse oxidativo semelhante, descartando a hipótese de uma intervenção na interação social. Apesar de nossos resultados refutarem alguns estudos, nossos dados corroboram com trabalhos de Filby e colaboradores que postulam que os indivíduos (dominante e subordinado) sofrem os mesmos níveis de estresse agudo durante as lutas agonísticas (FILBY et al., 2010). Este fato pode explicar o

fenômeno observado no grupo controle e pode ser o resultado da metodologia adotada no presente estudo, sendo necessárias análises durante um período mais longo para observar possíveis diferenças fisiológicas entre os sujeitos. Nosso estudo, nesse contexto, mostra-se ideal para analisar o efeito de episódios agressivos agudos e determinar os principais sistemas neuromoduladores envolvidos nesses comportamentos.

Ademais, observamos uma redução nos níveis de peroxidação lipídica, em ambos os sujeitos, nos grupos ACEA e AM-251 em comparação ao grupo controle. Este dado curioso corrobora, parcialmente, com outros achados que observaram associação entre a ativação do CB1r e um efeito antioxidante, tanto em modelo *in vitro* e *in vivo* (LUZ et al., 2021; PALOMBA et al., 2015). Nesse caso, o papel modulador do SEC sobre a homeostase oxidativa pode ser explicada pela presença de CB1r na membrana externa de mitocôndrias, implicando diretamente no funcionamento dessas organelas que desempenham um papel chave no equilíbrio energético e redox das células (BÉNARD et al., 2012). Em contrapartida, vários relatos têm demonstrado um papel oposto do CB1r na modulação do estado oxidativo, promovendo um aumento nos níveis de ERO's (PALOCZI et al., 2018). Tais efeitos diversos e contrastantes do SEC derivam de diferentes abordagens metodológicas (doses, concentrações e protocolos utilizados), bem como da grande complexidade do sistema, que está presente em diferentes compartimentos celulares, tipos celulares e amplamente expresso em todo o cérebro (REY et al., 2012). Nossos dados mostram essa dinâmica altamente complexa do sistema endocanabinóide, por isso, tanto o bloqueio quanto a ativação dos CB1r aparentemente tiveram o mesmo efeito sobre os níveis de peroxidação lipídica, mesmo que esse fenômeno esteja acompanhado de diferenças comportamentais entre os grupos ACEA e AM-251.

Nossa outra hipótese para explicar a diminuição dos níveis de peroxidação lipídica no grupo tratado com o agonista e antagonista, postula que a ativação ou o bloqueio CB1r pode favorecer o aumento de disponibilidade de endocanabinóides (AEA ou 2-AG) que ao serem sintetizados sob demanda, podem ligar-se aos receptores CB2. Este receptor, como relatado na introdução, faz parte do sistema imune e inúmeros relatos na literatura vinculam a ação dessas proteínas à proteção contra agentes pro-oxidantes (JAVED et al., 2016). Nesse estudo, Javed e colaboradores relatam que o CB2r exerce um papel neuroprotetor através da micróglia, prevenindo contra o estresse oxidativo e consequentemente atenuando níveis elevados de peroxidação lipídica (JAVED et al., 2016). No entanto, mais estudos são necessários para isolar esse fenômeno, utilizando um

co-tratamento com agonista do CB1r e o antagonista do CB2r para elucidar por qual via ou mecanismo este efeito antioxidante está de fato acontecendo.

Além disso, observamos que esse efeito contrastante da ativação ou bloqueio do CB1r exerceu uma ação semelhante nos níveis de tióis não-proteicos nos indivíduos dominantes dos grupos tratados com ACEA e AM-251. Este fato curioso desperta ainda mais o interesse para elucidar a particularidade desse fenômeno sobre os animais dominantes e não nos subordinados. Este resultado pode ser explicado pela capacidade de sujeitos dominantes recuperarem a homeostase fisiológica, como relatado em estudos de Filby e colaboradores, no qual observaram que alto status social está atrelado a uma rápida recuperação da saúde geral do indivíduo, permitindo que esses sujeitos mantenham-se no topo da hierarquia social (FILBY et al., 2010). Entretanto, nos trabalhos de Øverli e colegas, não fica claro se a própria classificação social é a causa ou consequência das diferenças observadas na fisiologia e do comportamento entre indivíduos dominantes e subordinados (ØVERLI et al., 2004). Nesse caso, investigar como o bloqueio ou a ativação do CB1r potencializa esse efeito pode elucidar os substratos neuronais envolvidos na agressão social e como essa dinâmica pode modular a saúde geral do indivíduo. Nessa perspectiva, nossos dados reforçam que o SEC possui um papel relevante na dinâmica comportamental, sendo um alvo terapêutico em potencial para tratar distúrbios agressivos em condições basais ou patológicas.

CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo mostra que a ativação do CB1r modula o comportamento tipo-agressivo e interfere parcialmente no estabelecimento da hierarquia social, através de uma via redox-independente. Sugerimos, assim, que o zebrafish é um modelo adequado para estudar o papel modulador do SEC no comportamento tipo-agressivo baseado no estudo das interações sociais presente na espécie. Assim, o tratamento agudo com alvo ao CB1r é uma ferramenta neurofarmacológica útil para elucidar o papel do SEC na interação social e no comportamento agressivo, permitindo translacionar com inúmeras patologias que tenham a agressividade como desordem comportamental.

REFERÊNCIAS

ALICZKI, M. et al. Involvement of 2-arachidonoylglycerol signaling in social challenge responding of male CD1 mice. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 12, p. 2157–2167, 2015.

ALLEN, J. J.; ANDERSON, C. A.; BUSHMAN, B. J. The General Aggression Model. **Current Opinion in Psychology**, v. 19, p. 75–80, 2018.

ALONSO, F. et al. Social and reproductive physiology and behavior of the Neotropical cichlid fish *Cichlasoma dimerus* under laboratory conditions. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 3, p. 559–570, 2011.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **DSM-5: manual diagnóstico e estatística de transtornos mentais**. [s.l.: s.n.].

BÉNARD, G. et al. Mitochondrial CB 1 receptors regulate neuronal energy metabolism. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 4, p. 558–564, 2012.

BEST, J. D.; ALDERTON, W. K. Zebrafish: An in vivo model for the study of neurological diseases. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 4, n. 3, p. 567–576, 2008.

BJØRKLUND, G. et al. Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorder. **Molecular Neurobiology**, v. 57, n. 5, p. 2314–2332, 2020.

BUSSE, B. et al. Zebrafish: An Emerging Model for Orthopedic Research. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 38, n. 5, p. 925–936, 2020.

CAHILL-SMITH, S.; LI, J. M. Oxidative stress, redox signalling and endothelial dysfunction in ageing-related neurodegenerative diseases: A role of NADPH oxidase 2. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 78, n. 3, p. 441–453, 2014.

CARMICHAEL, O.; LOCKHART, S. Neurotrophins and. **Brain Imaging in Behavioral Neuroscience**, n. November 2011, p. 289–320, 2012.

CAVALLINO, L. et al. Effect of previous fighting on the dynamic of agonistic encounters in zebrafish males. **Animal Cognition**, v. 23, n. 5, p. 999–1006, 2020.

CHANG, C. et al. Neurobiology of Stress Regulation of stress-provoked aggressive behavior using endocannabinoids. **Neurobiology of Stress**, v. 15, p. 100337, 2021.

CHEVALEYRE, V.; TAKAHASHI, K. A.; CASTILLO, P. E. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS. **Annual Review of Neuroscience**, v. 29, p. 37–76, 2006.

COCCARO, E. F.; LEE, R.; GOZAL, D. Elevated Plasma Oxidative Stress Markers in Individuals with Intermittent Explosive Disorder and Correlation with Aggression in Humans. **Biological Psychiatry**, v. 79, n. 2, p. 127–135, 2016.

CRAIG A, A.; BRAD J, B. Human aggression. **Annual Review of Psychology**, v. 53, p. 27–51, 2002.

DAHLBERG, L. L.; KRUG, E. G. Violência: um problema global de saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 11, n. suppl, p. 1163–1178, 2006.

DAINESE, E. et al. The endocannabinoid hydrolase FAAH is an allosteric enzyme. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020.

DE ABREU, M. S. et al. Neuropharmacology, pharmacogenetics and pharmacogenomics of aggression: The zebrafish model. **Pharmacological Research**, v. 141, n. December 2018, p. 602–608, 2019.

DE BOER, S. F. et al. The neurobiology of offensive aggression: Revealing a modular view. **Physiology and Behavior**, v. 146, p. 111–127, 2015.

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.

DREOSTI, E. et al. Development of social behavior in young zebrafish. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 9, n. AUGUST, p. 1–9, 2015.

FASANO, S. et al. The Endocannabinoid System : An Ancient Signaling Involved in the Control of Male Fertility. v. 124, p. 112–124, 2009.

FEIGIN, V. L. et al. Burden of Neurological Disorders across the US from 1990-2017: A Global Burden of Disease Study. **JAMA Neurology**, v. 78, n. 2, p. 165–176, 2021.

FERRIS, C. F. et al. Imaging the neural circuitry and chemical control of aggressive motivation. **BMC Neuroscience**, v. 9, p. 1–35, 2008.

FILBY, A. L. et al. Physiological and health consequences of social status in zebrafish (*Danio rerio*). **Physiology and Behavior**, v. 101, n. 5, p. 576–587, 2010.

FLANIGAN, M. E.; RUSSO, S. J. Recent advances in the study of aggression. **Neuropsychopharmacology**, v. 44, n. 2, p. 241–244, 2019.

FOWLER, C. J. The endocannabinoid system – current implications for drug development. **Journal of Internal Medicine**, v. 290, n. 1, p. 2–26, 2021.

FOX, H. E. et al. Stress and dominance in a social fish. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 16, p. 6463–6469, 1997.

GALLELLI, C. A. et al. Modulation of the oxidative stress and lipid peroxidation by endocannabinoids and their lipid analogues. **Antioxidants**, v. 7, n. 7, 2018.

GAONI, Y.; MECHOULAM, R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 8, p. 1646–1647, 1964.

GU, F.; CHAUHAN, V.; CHAUHAN, A. Glutathione redox imbalance in brain disorders. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 18, n. 1, p. 89–95, 2015.

GULLAPALLI, S. et al. Characterization of active and inactive states of CB1 receptor and the differential binding state modulation by cannabinoid agonists, antagonists and inverse agonists. **Neuropharmacology**, v. 58, n. 8, p. 1215–1219, 2010.

HARTMANN, A. et al. Cannabidiol attenuates aggressive behavior induced by social

isolation in mice: Involvement of 5-HT_{1A} and CB₁ receptors. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 94, n. October 2018, p. 109637, 2019.

HEBERT-CHATELAIN, E. et al. A cannabinoid link between mitochondria and memory. **Nature**, v. 539, n. 7630, p. 555–559, 2016.

HILLARD, C. J. et al. Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor (CB₁). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 289, n. 3, p. 1427–1433, 1999.

HJORTH, S. et al. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. n. July, p. 1092–1101, 2007.

HOSIE, S. et al. Altered amygdala excitation and CB₁ receptor modulation of aggressive behavior in the neuroligin-3R451C mouse model of autism. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, n. August, p. 1–10, 2018.

HUBER, R.; BRENNAN, P. A. Aggression. **Advances in Genetics**, v. 75, p. 1–6, 2011.

ISAKSSON, C. et al. Aggression, but not testosterone, is associated to oxidative status in a free-living vertebrate. **Behaviour**, v. 148, n. 5–6, p. 713–731, 2011.

JAVED, H. et al. Cannabinoid type 2 (CB₂) receptors activation protects against oxidative stress and neuroinflammation associated dopaminergic neurodegeneration in rotenone model of parkinson's disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, n. AUG, p. 1–14, 2016.

JIMENEZ-BLASCO, D. et al. Glucose metabolism links astroglial mitochondria to cannabinoid effects. **Nature**, v. 583, n. 7817, p. 603–608, 2020.

KENDALL, D. A.; YUDOWSKI, G. A. Cannabinoid Receptors in the Central Nervous System : Their Signaling and Roles in Disease. v. 10, n. January, p. 1–10, 2017.

KIM, J. et al. In vitro studies on therapeutic effects of cannabidiol in neural cells: Neurons, glia, and neural stem cells. **Molecules**, v. 26, n. 19, p. 1–33, 2021.

KOLLA, N. J.; BORTOLATO, M. The role of monoamine oxidase A in the neurobiology of aggressive, antisocial, and violent behavior: A tale of mice and men. **Progress in Neurobiology**, v. 194, p. 101875, 2020.

KRUG, R. G.; CLARK, K. J. Elucidating cannabinoid biology in zebrafish (*Danio rerio*). **Gene**, v. 570, n. 2, p. 168–179, 2015.

KRUK, M. R. Ethology and pharmacology of hypothalamic aggression in the rat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 15, n. 4, p. 527–538, 1991.

LAM, C. S.; RASTEGAR, S.; STRÄHLE, U. Distribution of cannabinoid receptor 1 in the CNS of zebrafish. **Neuroscience**, v. 138, n. 1, p. 83–95, 2006.

LARSON, E. T.; O'MALLEY, D. M.; MELLONI, R. H. Aggression and vasotocin are associated with dominant-subordinate relationships in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 167, n. 1, p. 94–102, 2006.

LECTURE, N. The structure and connexions of neurons. 1906.

LIU, L. et al. Association of Corticotropin-Releasing Hormone Receptor-1 Gene Polymorphisms and Personality Traits with Violent Aggression in Male Adolescents. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 70, n. 2, p. 145–154, 2020.

LUCAS LUZ, W. et al. Putative Activation of the CB1 Cannabinoid Receptors Prevents Anxiety-Like Behavior, Oxidative Stress, and GABA Decrease in the Brain of Zebrafish Submitted to Acute Restraint Stress. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 14, n. January, p. 1–7, 2021.

MARICHAL-CANCINO, B. A.; FAJARDO-VALDEZ, A.; RUIZ-CONTRERAS, A. E. Advances in the Physiology of GPR55 in the Central Nervous System. n. 55, p. 771–778, 2017.

MATSUDA, L. A. et al. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561–564, 1990.

MCPARTLAND, J. M.; GLASS, M. Functional mapping of cannabinoid receptor homologs in mammals, other vertebrates, and invertebrates. **Gene**, v. 312, n. 1–2, p. 297–303, 2003.

MECHOULAM, R.; PARKER, L. A. The endocannabinoid system and the brain. **Annual Review of Psychology**, v. 64, p. 21–47, 2013.

MENTESANA, L.; ADREANI, N. M. Acute aggressive behavior perturbs the oxidative status of a wild bird independently of testosterone and progesterone. **Hormones and Behavior**, v. 128, n. May 2020, p. 104913, 2021.

MICZEK, K. A. et al. 7 Neurochemistry and Molecular Neurobiology of Aggressive Behavior. 2007.

MILLER, N. S.; IPEKU, R.; OBERBARNSCHEIDT, T. A review of cases of marijuana and violence. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 5, p. 1–14, 2020.

MILLER, T. H. et al. Social status–dependent shift in neural circuit activation affects decision making. **Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 8, p. 2137–2148, 2017.

MUELLER, T. et al. The dorsal pallium in zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Teleostei). **Brain Research**, v. 1381, p. 95–105, 2011.

MÜLLER, T. E. et al. Role of the serotonergic system in ethanol-induced aggression and anxiety: A pharmacological approach using the zebrafish model. **European Neuropsychopharmacology**, v. 32, p. 66–76, 2020.

MUMTAZ, F. et al. Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model—A comprehensive review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 105, n. May, p. 1205–1222, 2018.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61–65, 1993.

MURRAY-CLOSE, D.; OSTROV, J. M. A longitudinal study of forms and functions of aggressive behavior in early childhood. **Child Development**, v. 80, n. 3, p. 828–842, 2009.

NARVAES, R.; DE ALMEIDA, R. M. M. Aggressive behavior and three neurotransmitters: Dopamine, GABA, and serotonin—a review of the last 10 years. **Psychology and Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 601–607, 2014.

NAVARRETE, F. et al. Cannabis Use in Pregnant and Breastfeeding Women: Behavioral and Neurobiological Consequences. **Frontiers in Psychiatry**, v. 11, n. November, p. 1–15, 2020.

NELSON, R. J.; CHIAVEGATTO, S. Molecular basis of aggression. **Trends in Neurosciences**, v. 24, n. 12, p. 713–719, 2001.

NELSON, R. J.; TRAINOR, B. C. Neural mechanisms of aggression. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 7, p. 536–546, 2007.

NEUMANN, I. D.; VEENEMA, A. H.; BEIDERBECK, D. I. Aggression and anxiety: Social context and neurobiological links. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 4, n. MAR, p. 1–16, 2010.

OLIVEIRA, R. F.; SILVA, J. F.; SIMÕES, J. M. Fighting zebrafish: Characterization of aggressive behavior and winner-loser effects. **Zebrafish**, v. 8, n. 2, p. 73–81, 2011.

ORR, S. A. et al. Social Experience Regulates Endocannabinoids Modulation of Zebrafish Motor Behaviors. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 15, n. May, 2021.

ØVERLI, Ø. et al. Stress coping style predicts aggression and social dominance in rainbow trout. **Hormones and Behavior**, v. 45, n. 4, p. 235–241, 2004.

PALOCZI, J. et al. Neuroprotection in Oxidative Stress-Related Neurodegenerative Diseases: Role of Endocannabinoid System Modulation. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 29, n. 1, p. 75–108, 2018.

PALOMBA, L. et al. Negative regulation of leptin-induced reactive oxygen species (ROS) formation by cannabinoid CB1 receptor activation in hypothalamic neurons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 22, p. 13669–13677, 2015.

PANDOLFI, M.; SCAIA, M. F.; FERNANDEZ, M. P. Sexual Dimorphism in Aggression: Sex-Specific Fighting Strategies Across Species. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 15, n. June, p. 1–12, 2021.

PATKI, G. et al. Depression , anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and in fl ammation in a rat model of social stress. **Brain Research**, v. 1539, p. 73–86, 2013.

PATKI, G. et al. High aggression in rats is associated with elevated stress, anxiety-like behavior, and altered catecholamine content in the brain. **Neuroscience Letters**, v. 584, p. 308–313, 2015.

PAUFF, S. M.; MILLER, S. C. 基因的改变 NIH Public Access. **Bone**, v. 78, n. 2, p. 711–716, 2012.

PAULL, G. C. et al. Dominance hierarchies in zebrafish (*Danio rerio*) and their relationship with reproductive success. **Zebrafish**, v. 7, n. 1, p. 109–117, 2010.

PELLEGRINI, A. D. et al. Social dominance in preschool classrooms. **Journal of**

Comparative Psychology, v. 121, n. 1, p. 54–64, 2007.

PETERS, K. Z.; CHEER, J. F.; TONINI, R. Trends in Modulating the Neuromodulators : Dopamine , Serotonin , and the Endocannabinoid System. **Trends in Neurosciences**, v. 44, n. 6, p. 464–477, [s.d.].

PINHO COSTA, J. L. G. et al. Neurobiologia da Cannabis: Do sistema endocanabinoide aos transtornos por uso de Cannabis. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 60, n. 2, p. 110–122, 2011.

REY, A. A. et al. Biphasic effects of cannabinoids in anxiety responses: CB1 and GABA B receptors in the balance of gabaergic and glutamatergic neurotransmission. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 12, p. 2624–2634, 2012.

RICO, E. P. et al. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 33, n. 6, p. 608–617, 2011.

RODRIGUEZ-ARIAS, M. et al. CB1 cannabinoid receptor-mediated aggressive behavior. **Neuropharmacology**, v. 75, p. 172–180, 2013.

ROHLEDER, C. et al. Cannabidiol as a potential new type of an antipsychotic. A critical review of the evidence. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. NOV, p. 1–11, 2016.

SAPOLSKY, R. M. The influence of social hierarchy on primate health. **Science**, v. 308, n. 5722, p. 648–652, 2005.

SIES, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 2015.

SIGNALING, E. et al. Review. 2012.

SLOMAN, K. A. et al. The effect of social stress on the Standard Metabolic Rate (SMR) of brown trout, *Salmo trutta*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 23, n. 1, p. 49–53, 2000.

SORIA-GOMEZ, E. et al. The Endocannabinoid System in the Control of Behavior. **Handbook of Neurobehavioral Genetics and Phenotyping**, p. 323–355, 2017.

STEARDO, L. et al. Endocannabinoid system as therapeutic target of ptsd: A systematic review. **Life**, v. 11, n. 3, p. 1–15, 2021.

STUMP, B. E. WHO Report : Millions Have Neurological IS USED TOO OFTEN IN THE WRONG FIND FOR PATIENTS WHO BENEFITED. p. 2007, 2007.

TAKAHASHI, A. et al. Aggression, social stress, and the immune system in humans and animal models. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, n. March, 2018.

TANAKA, M.; VÉCSEI, L. Monitoring the redox status in multiple sclerosis. **Biomedicines**, v. 8, n. 10, p. 1–35, 2020.

TELES, M. C.; OLIVEIRA, R. F. Chapter 20 Quantifying Aggressive Behavior in Zebrafi sh. v. 1451, p. 293–305, 2016.

THEODORIDI, A.; TSALAFOUTA, A.; PAVLIDIS, M. Acute exposure to fluoxetine alters aggressive behavior of zebrafish and expression of genes involved in serotonergic system

regulation. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, n. APR, p. 1–9, 2017.

VAN MEER, P.; RABER, J. Mouse behavioural analysis in systems biology. **Biochemical Journal**, v. 389, n. 3, p. 593–610, 2005.

WANG, J.; CAO, H. Zebrafish and medaka: Important animal models for human neurodegenerative diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, 2021.

WANG, J.; UEDA, N. Biology of endocannabinoid synthesis system. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 89, n. 3–4, p. 112–119, 2009.

WANG, P. et al. Targeting redox-altered plasticity to reactivate synaptic function: A novel therapeutic strategy for cognitive disorder. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 11, n. 3, p. 599–608, 2021.

WATANABE, N.; YAMAMOTO, M. Neural mechanisms of social dominance. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. APR, 2015.

WAY, G. P. et al. A comparison of methodologies to test aggression in zebrafish. **Zebrafish**, v. 12, n. 2, p. 144–151, 2015.

WOLF, B. M. U.; GOLDBERG, Y.; FREEDMAN, M. in *Dementia*. p. 783–803, 2018.

WRANGHAM, R. W. Hypotheses for the evolution of reduced reactive aggression in the context of human self-domestication. **Frontiers in Psychology**, v. 10, n. AUG, p. 1–11, 2019.

WRANGHAMA, R. W. Two types of aggression in human evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 2, p. 245–253, 2017.

ZASLER, N. D.; MARTELLI, M. F.; JACOBS, H. E. **Neurobehavioral disorders**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2013. v. 110

ZHU, W.; ZHOU, X.; XIA, L. X. Brain structures and functional connectivity associated with individual differences in trait proactive aggression. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

ANEXO 1: Dados comportamentais.

Grupo Controle				
	Dominante		Subordinado	
	Média	E. P da média	Média	E. P da média
<i>Atacar</i>	39.38	± 7.08	4.69*	± 1.50
<i>Morder</i>	23.54	± 5.73	4.84*	± 2.55
<i>Perseguir</i>	58.62	± 10.79	13.15*	± 4.83
<i>Recuar</i>	9.53	± 3.87	62.92	± 11.55
<i>Fugir</i>	13.15	± 4.83	58.62	± 10.80
<i>Congelar</i>	2.23	± 0.75	3.462	± 0.74

Grupo ACEA				
	Dominante		Subordinado	
	Média	E. P da média	Média	E. P da média
<i>Atacar</i>	6.67 ^{#a}	± 1.50	2.83 ^b	± 1.13
<i>Morder</i>	6.20 ^{#a}	± 2.39	8.00 ^b	± 5.68
<i>Perseguir</i>	29.07	± 7.11	19.50	± 9.39
<i>Recuar</i>	5.80	± 2.27	70.33	± 12.9
<i>Fugir</i>	3.86	± 1.57	54.33	± 13.0
<i>Congelar</i>	3.80	± 0.58	4.16	± 1.07

Grupo AM-251				
	Dominante		Subordinado	
	Média	E. P da média	Média	E. P da média
<i>Atacar</i>	39.50	± 11.53	2.83 ^c	± 1.13
<i>Morder</i>	30.83	± 3.77	8.00 ^c	± 5.68
<i>Perseguir</i>	54.33	± 13.00	19.50	± 9.39
<i>Recuar</i>	10.83	± 5.64	70.33	± 12.9
<i>Fugir</i>	19.50	± 9.39	54.33	± 13.0
<i>Congelar</i>	2.833	± 0.79	4.16	± 1.07

Tabela 2: Quantificação dos comportamentos agressivos e defensivos durante os cinco minutos iniciais e finais do experimento comportamental para os grupos CTRL (N: 26), ACEA (N: 30) e AM-251 (N: 12). Os parâmetros Atacar, Morder, Perseguir, Recuar, Fugir e Congelar foram quantificados pelo número de ocorrências. Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média, considerando $p < 0,05$. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido do teste pós-teste de Dunn para múltiplas comparações. * $p < 0,05$ vs DOM+CTRL; [#] $p < 0,05$ vs DOM+CTRL; ^a $p < 0,05$ vs DOM+AM-251; ^b $p < 0,05$ vs DOM+ACEA; ^c $p < 0,05$ vs DOM+AM-251. DOM: Dominante; CTRL: Grupo de controle.

ANEXO 2: Dados bioquímicos

LPO				
	Dominante		Subordinado	
	%	Desvio Padrão	%	Desvio Padrão
<i>Controle</i>	100	± 6.16	100	± 3.38
<i>ACEA</i>	64.68*	± 3.56	53.25 [#]	± 4.22
<i>AM-251</i>	63.96*	± 4.50	59.93 [#]	± 1.60

NPSH				
	Dominante		Subordinado	
	%	Desvio Padrão	%	Desvio Padrão
<i>Controle</i>	100	± 6.59	100	± 10.71
<i>ACEA</i>	145.62 ^a	± 15.05	115.19	± 8.65
<i>AM-251</i>	153.91 ^a	± 12.05	108.30	± 8.88

Tabela 3: Níveis de MDA e NPSH no cérebro do zebrafish. CTRL (N: 10), ACEA (N: 10) e AM-251 (N: 10). Os valores foram expressos em porcentagem do controle ± erro padrão, considerando $p < 0,05$. Foi utilizado análise de variância de duas vias (ANOVA) seguida dos pós-teste de Tukey para múltiplas comparações. * $p < 0,05$ vs DOM+CTRL; [#] $p < 0,05$ vs SUB+CTRL; ^a $p < 0,05$ vs DOM+CTRL. DOM: Dominante; CTRL: Grupo de controle

ANEXO 3: Certificado de Menção Honrosa pela XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC 2019)

XLII Reunião Anual da SBNeC

01 a 04 de Outubro de 2019

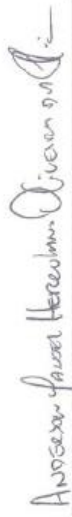


Certificado

Certificamos que

o resumo **" 14.005-ESTADO REDOX NO CÉREBRO DE Danio rerio (ZEBRAFISH) NO COMPORTAMENTO TIPO-AGRESSIVO: POSSÍVEL PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR CANABINÓIDE TIPO 1 (CB1)."** EMERSON FEIO PINHEIRO ¹, PATRICK BRUNO CARDOSO COSTA ¹, WALDO LUCAS LUZ DA SILVA ¹, NADYME ASSAD HOLANDA DA SILVA ¹, KATEN BROUDEUR ³, EVANDER DE JESUS BATISTA ⁴, SUELLEN ALESSANDRA SOARES DE MORAIS ¹, ADELAIDE DA CONCEIÇÃO FONSECA PASSOS ¹, KAREN RENATA HERCULANO MATOS OLIVEIRA ¹, AMAURI GOUVEIA JUNIOR ¹, ANDERSON MANOEL HERCULANO OLIVEIRA DA SILVA ¹¹ UFPA³ UM - University of Michigan ⁴ NMT recebeu a **Menção Honrosa** durante a

XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento - SBNeC, realizada no período de 01 a 04 de outubro de 2019, no Campos do Jordão Convention Center, em Campos do Jordão, SP.


 Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva
 Presidente da SBNeC















