

DESCRIÇÃO POR CLAE (HPLC) DA CONCENTRAÇÃO DE NOREPINEFRINA, DOPAMINA E SEROTONINA EM DIFERENTES REGIÕES CEREBRAIS DE CAMUNDONGOS SWISS WEBSTER ALTAMENTE AGRESSIVOS

Fernanda da Silva Oliveira¹, Kelly Cristina Demarque¹, Janáina Alves Rangel¹, Wanderson Silva Batista¹, Lucas dos Santos Gameiro² & Gabriel Melo de Oliveira^{1#}

RESUMO

O camundongo da linhagem Swiss Webster demonstra um variado e complexo comportamento individual e social. Na idade adulta, tendem a estabelecer a hierarquia de dominância (com presença de agressividade com intensidade variável) e buscam o territorialismo e a exclusividade para reprodução. Em 30% dos reagrupamentos de machos na idade adulta observamos a presença de indivíduos dominantes altamente agressivos. Nosso objetivo nesse trabalho é descrever a concentração de neurotransmissores como: a) Norepinefrina (NE); b) Dopamina (DA) e c) Serotonina (5-HT) nas respectivas regiões cerebrais: a) Amígdala; b) Corpo estriado, c) Hipocampo e d) Córtex pré-frontal. Realizamos essa dosagem por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em diferentes categorias como: AgR, altamente agressivos; AgD, agredidos e Har, harmônicos. Nossos resultados demonstram que no grupo AgR a concentração de DA está 85% mais elevada do que no grupo Har e que foi maior a diferença na relação 5-HT/DA na maioria das áreas estudadas. Em conclusão, o comportamento altamente agressivo dos camundongos Swiss Webster, machos e reagrupados na idade adulta está relacionado ao desequilíbrio dos neuro transmissores, principalmente da DA no córtex pré-frontal. CEUA/FIOCRUZ LW-5/12.

Palavras-chaves: Camundongo. Swiss Webster. Agressividade. Neurotransmissores.

1. Laboratório de Biologia Celular – Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ – Rio de Janeiro;
2. Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Biofilmes - Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ – Rio de Janeiro.

Autor para correspondência:
Gabriel Oliveira

E-mail: gmoliveira@ioc.fiocruz.br

Recebido para a Publicação: 15 de maio de 2014
Aceito para a publicação: 15 de julho de 2014

1. INTRODUÇÃO

O camundongo usado em biotérios é um mamífero da família *Muridae*, sub-família *Murinae*, da ordem *Rodentia* e gênero *Mus*. O seu nome científico é *Mus musculus*^{1,2}. A linhagem Swiss Webster, caracteriza-se pela variabilidade genética (heterogênicos-*outbred*), ou seja, não devem apresentar mais de 1% de consanguinidade por geração³. São albinos e apresentam alto ganho de peso, podendo chegar a 50 a 60 gramas com 16 semanas de vida

(machos)⁴. Apresentam um complexo repertório de comportamento individual e social. São ariscos e dóceis, com relativa facilidade de manipulação quando adaptados ao ambiente e ao manipulador². Suas principais atividades num biotério são a busca por alimento, exploração do ambiente, repouso, auto-higienização e a procura pelo contato físico entre os indivíduos. A frequência destas atividades diferem entre faixas etárias (4^a a 8^a semana de vida) e grupos⁵. Desde o agrupamento ao desmame (21 dias) até a 8^a semana de vida, de forma geral, não observamos uma estrutura hierárquica definida

claramente, sugerindo uma relação fraternal entre os indivíduos, com baixo a ausente de padrões de agressividade⁵. Curiosamente, estes animais agrupados durante a infância são capazes de se reconhecer e se proteger durante a idade adulta na presença de um grupo diferente de camundongos⁶. Entre a 12^a e a 16^a semana de vida, quando dois grupos de Swiss Webster (G1 e G2, n=5) são colocados num Sistema de Gaiolas Interligadas (SGI) há a estruturação despótica (agressiva) da hierarquia, onde o dominante demonstra maior agressividade aos animais do grupo oposto⁶. Acreditamos que o objetivo desta dominância é a exclusividade do território e conseqüentemente o aumento da probabilidade de acasalamento e acessibilidade ao alimento^{6,7}.

Apesar de serem relativamente tranquilos à manipulação, podem ser altamente agressivos, principalmente no reagrupamento de machos adultos. A incidência e a intensidade da agressividade entre esses animais são variáveis. Observamos que em 10% dos reagrupamentos de machos em idade adulta não há Padrões de Comportamento Agressivo (PCA). Individualmente, em 30% desses agrupamentos apresentam animais levemente agressivos. Apenas 10% do total de animais reagrupados exercem sua dominância com alta agressividade e aproximadamente 60% dos indivíduos, mesmo em grupos com PCA, não se envolvem nos episódios agressivos⁸. Então sugerimos uma estrutura hierárquica composta de 1) Dominante - apenas um animal, com diferentes níveis de agressividade; 2) Subordinados disputantes - número variável de animais agressores/agredidos que buscam a dominância do grupo; 3) Subordinados neutros - animais que não se envolvem nos episódios agressivos e 4) Subordinados alvos - que sofrem 20 a 30% do total de agressões do dominante^{7,8}.

Estamos buscando esclarecer a(s) causa(s) desta variação na intensidade da agressividade e principalmente o porquê que alguns indivíduos são altamente agressivos e outros não nos seus respectivos reagrupamentos de machos adultos. Nossas observações sugerem que a intensidade da agressividade individual esteja relacionada a animais com perfil hiperativo (*anxiety-like*) no Teste

da Suspensão da Cauda (TSC)⁸ e que o descontrole da agressividade sugere estar relacionada a algum transtorno neuropsiquiátrico do indivíduo agressor, possivelmente ocasionado por uma complexa combinação de fatores genéticos⁹ e ambientais (desmame precoce, por exemplo)^{10,11}. Destacamos a possibilidade de algum trauma, em idade precoce, e o desenvolvimento de um Transtorno de Estresse Pós Traumático (TEPT) com a presença de agressividade exacerbada durante a idade adulta¹².

Os camundongos são amplamente utilizados como modelo experimental para o estudo dos transtornos psiquiátricos¹³. Psicopatologias como ansiedade¹⁴, depressão¹⁵, esquizofrenia¹⁶ são desenvolvidas por manipulação genética e manejo nestes animais. A etiologia destas patologias são complexas e variadas. Porém, o estudo das vias de expressão, ação e recaptação de neurotransmissores são amplamente estudados, principalmente para a busca de fármacos que possam minimizar os sintomas destes transtornos^{17,18,19}.

O objetivo principal do nosso trabalho foi avaliar a concentração dos neurotransmissores: a) Norepinefrina; b) Dopamina; e c) Serotonina nas seguintes regiões cerebrais, amígdala, corpo estriado, hipocampo e córtex frontal. Realizamos esta dosagem através da utilização da cromatografia líquida de alta eficiência CLAE (*High Performance/Pressure Liquide Chromatography - HPLC*) e comparamos a expressão dos respectivos neurotransmissores nos animais altamente agressivos (AgR), indivíduos agredidos (AgD) e animais que pertenciam a agrupamentos pacíficos, na baixa ou ausente presença de agressividade (Har). Desta maneira, esperamos conseguir esclarecer parte da(s) causa(s), em nível neurológico, da diferença da agressividade entre os camundongos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Requisitamos ao Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz

(CECAL/FIOCRUZ) camundongos da linhagem Swiss Webster, machos com três semanas de vida. Recebemos estes animais no Setor de Experimentação Animal dos Laboratórios de Biologia Celular e Inovações em Terapias, Ensino e Biofilmes do Instituto Oswaldo Cruz (SEA LBC/LITEB) e adaptamos estes animais ao novo ambiente por uma semana. Esta adaptação foi realizada em estantes ventiladas com a temperatura, umidade e fotoperíodo controlados segundo aos padrões e normatizações ambientais vigentes. Foi oferecido água e ração a vontade e a rotina de higienização foi realizada duas vezes por semana. Os procedimentos desse projeto foram realizados sob licença número LW-5/12 da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA/FIOCRUZ).

Modelo Espontâneo de Agressividade (MEA)

Estruturamos nosso modelo através do agrupamento dos camundongos (3ª semana de vida), individualmente identificados (c1 a c10), em grupos de 10 animais e em 10 grupos (A1 ao A10) que denominamos de *Agrupamentos*. Realizamos as avaliações comportamentais em todos os grupos entre a 4ª e a 8ª semana de vida. Na 10ª semana de vida realizamos o reagrupamento de todos os animais (R1 ao R10) através do sorteio dos indivíduos do agrupamento e formando os novos grupos do *Reagrupamento*. Desta maneira, conseguimos compor um reagrupamento aleatório sem que ocorresse qualquer forma de escolha pessoal. Realizamos novamente as avaliações comportamentais em todos os indivíduos entre a 12ª e a 16ª semana de vida⁸.

Etograma

Realizamos a filmagem (vista superior) nos agrupamentos (4ª, 6ª e 8ª semana de vida) e posteriormente nos reagrupamentos (12ª, 14ª e 16ª semana de vida) de cada grupo por 60 minutos contínuos através de uma câmera Canon PowerShot SX20 IS® (Lake Success, NY - EUA). Con-

seguimos um total de 3.600 minutos de gravação para cada ensaio e registramos por fotografia as alterações mais representativas de cada grupo. A partir destas filmagens determinamos os quesitos avaliados em nosso etograma: a) identificação do padrão de comportamento agressivo (PCA), como mordidas, ferimentos e lesões ocasionadas por lutas nos indivíduos de cada grupo. b) intensidade do PCA de 1 a 4+ correspondente a cada grupo e a cada indivíduo. Determinamos que o escore zero (0) está relacionado aos grupos com a ausência e/ou presença de vocalizações e perseguições, contudo, não apresentavam sinais de mordidas ou lesões no corpo do animal. O escore de uma cruz (1+) a presença de eventos agressivos reduzidos, com ou sem caráter sexual (tentativa de coito entre os indivíduos) e a presença de pequenas mordidas ou ferimentos em algum lugar do corpo do animal. Para o escore duas cruces (2+) para os grupos, correlacionamos a presença de reduzidos eventos agressivos sem caráter sexual e discretos sinais de mordidas na região da cauda, dorso ou bolsa escrotal dos indivíduos. O escore três cruces (3+) está relacionado a presença de eventos agressivos moderados no grupo (com ou sem especificidade entre os indivíduos) e a observação de ferimentos e lesões moderadas na cauda, dorso e bolsa escrotal nos animais. Finalizando, o escore quatro cruces (4+) alta frequência (ou intensidade) de eventos agressivos (com ou sem especificidade entre os indivíduos) e a presença de marcantes de lesões e ferimentos na cauda, dorso e bolsa escrotal. Em alguns casos, os ferimentos podem ocorrer com variáveis intensidades, em outros pontos do corpo como tórax, abdômen e patas dianteiras⁸.

Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

Na 16ª semana de vida realizamos a identificação dos animais agressores, agredidos e dos reagrupamentos que apresentaram baixa ou ausente agressividade. Categorizamos, através do etograma, 1) AgR, indivíduos altamente agressivos; 2) AgD, indivíduos que sofriam as agressões, com PCA_{individual} entre 3 e 4+ e c) Har, indivíduos origi-

nários de reagrupamentos pacíficos ou harmônicos. Realizamos a eutanásia dos animais e coletamos o cérebro colocando em temperatura de -70°C . Estes cérebros congelados foram dissecados e realizamos a identificação e separação das seguintes áreas: a) Amígdala, corpo amiglóide localizado na base cerebral e relacionado ao sistema límbico (regulação das emoções, como o medo e do comportamento social); b) Corpo estriado, é um dos núcleos da base, compondo o do diencéfalo e relacionado a coordenação motora, emoções e cognição; c) Hipocampo, estrutura localizada nos lobos temporais, relacionado a memória e o sistema límbico; d) Córtex pré-frontal, é a parte anterior do lobo frontal do cérebro, localizado anteriormente ao córtex motor primário e ao córtex pré-motor. Esta região cerebral está relacionada ao planejamento de comportamentos, expressão da personalidade, tomadas de decisões e modulação de comportamento social. O sistema cromatográfico utilizado foi um sistema de CLAE/HPLC (Waters, modelo 2690), equipado com um detector de UV/VIS e um detector eletroquímico. O detector UV/VIS utilizado foi de fotodiodos (Water, modelo 996 Photodiode Array detector). As amostras foram submetidas a um solvente e introduzida na coluna cromatográfica preenchida com a fase estacionária (FE). O solvente (Fase Móvel - FM) foi bombeado com vazão constante e deslocou os componentes da mistura através da coluna. Os componentes se distribuíram entre as duas fases de acordo com suas afinidades. Ao sair da coluna, os componentes passaram por um detector que emitiu um sinal elétrico o qual foi registrado, constituindo um cromatograma, ou seja, a concentração proteica de cada neurotransmissor: a) norepinefrina (NE); b) dopamina (DA) e c) serotonina (5-HT) em nanograma por miligrama (ng/mg). Também calculamos a relação entre dopamina e a serotonina através da fórmula: $[] 5\text{-HT} / [] \text{DA} = r$.

Análises estatísticas

Aplicamos diversos testes estatísticos dependendo da metodologia aplicada. Em relação a qua-

lificação do PCA, após determinar os escores de 1 a 4 cruces, realizamos a quantificação conjunta dos ensaios determinando o percentual de cada escore no total de animais. Na estruturação dos resultados estabelecemos a média e o desvio padrão ($\pm\text{SD}$). A partir deste valor determinamos a diferença de valores entre as categorias. Para a avaliação da significância dos resultados utilizamos o teste *T student* aplicando um valor de significância de $p \leq 0,05$ entre todos os grupos estudados e confirmamos com o teste de *Mann Whitney* (não paramétrico) utilizado para comparar todos os grupos de dados (software SPSS versão 8.0) e os valores de significância definido por $p \leq 0,05$ e expressos por símbolos em cada figura.

3 RESULTADOS

Primeiramente nossos resultados descrevem os valores médios em todas as regiões do cérebro dos respectivos neurotransmissores (Figura 1). Os animais AgR apresentam um aumento significativo dos valores médios de dopamina ($14,7 \pm 2,0$ ng/mg) e uma diminuição da serotonina ($3,0 \pm 0,5$ ng/mg) em relação ao grupo Har (DA: $8,4 \pm 1,0$ e 5-HT: $6,4 \pm 1,0$ ng/mg). Assim, observamos que os animais AgR ($r=0,2$) demonstrou uma diferença maior entre as concentrações de dopamina e serotonina quando comparado com o Har ($r=0,8$). Os animais AgD também apresentaram diferença significativa entre a NE ($3,3 \pm 0,5$ ng/mg) quando comparado com o Har (NE: $1,9 \pm 0,2$).

Na região da amígdala (Fig. 2), os animais altamente agressivos e os agredidos apresentaram diminuição de DA ($2,4 \pm 0,2$ e $3,0 \pm 0,2$ ng/mg) e de 5-HT ($1,7 \pm 0,2$ e $2,3$ ng/mg, respectivamente) quando comparado com os animais sem agressões (DA: $10,4 \pm 1,0$ e 5-HT: $6,2 \pm 1,0$ ng/mg). Apesar de inferiores, as concentrações desses dois neurotransmissores estavam mais próximas nesta região em todas as categorias estudadas (AgR: $r=0,7$ - AgD: $r=0,8$ - Har: $r=0,6$). Nos animais AgD, a NE ($1,8 \pm 0,2$ ng/mg) foi significativamente menor do que os animais Har ($3,7 \pm 0,2$ ng/mg).

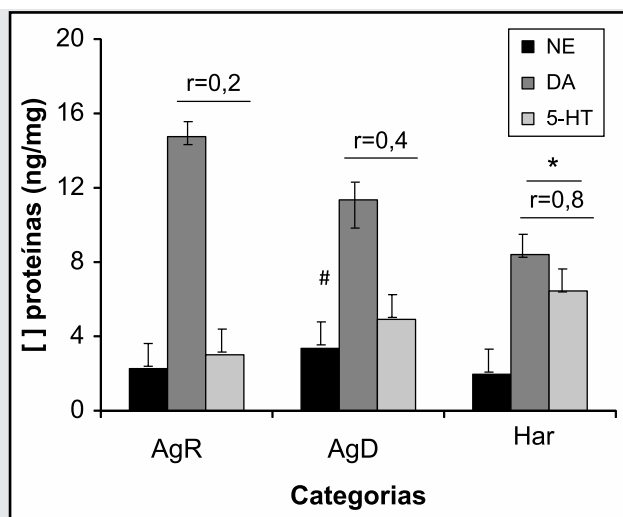


Figura 1: Valores médios dos neurotransmissores – Cérebro: Calculamos os valores médios da concentração proteica (ng/mg) das regiões, amígdala, corpo estriado, hipocampo e córtex pré-frontal. Avaliamos a diferença de concentração de norepinefrina (NE), dopamina (DA) e serotonina (5-HT) entre as categorias: AgR, animais altamente agressivos; AgD, indivíduos agredidos e Har, animais pertencentes a grupos com baixa ou ausente agressividade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na 16ª semana de vida. (*) indica uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os valores médios de DA e 5-HT do grupo Har quando comparados com as outras categorias AgR e AgD. (#) indica uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os valores médios de NE do grupo AgD quando comparados com as outras categorias AgR e Har.

No corpo estriado (Fig. 3), a DA dos grupos AgR ($32,3 \pm 2,0$ ng/mg) e AgD ($37,6 \pm 2,0$ ng/mg) demonstrou um aumento significativo em relação a categoria Har ($12,9 \pm 1,0$ ng/mg). Além disso, a concentração de serotonina do grupo AgR ($3,0 \pm 0,2$ ng/mg) foi estatisticamente inferior aos valores de Har ($11,2 \pm 1,0$ ng/mg). Também foi maior a diferença da concentração entre esses dois neurotransmissores. A diferença entre 5-HT/DA foi maior nos grupos AgR ($r=0,1$) e AgD ($r=0,2$) quando comparado com o grupo Har ($r=0,9$).

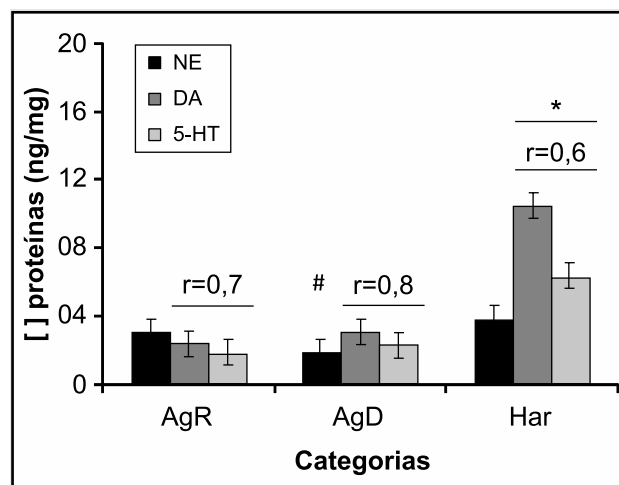


Figura 2: Valores médios dos neurotransmissores – Amígdala: Calculamos os valores médios da concentração proteica (ng/mg) da região da amígdala. Avaliamos a diferença de concentração de norepinefrina (NE), dopamina (DA) e serotonina (5-HT) entre as categorias: AgR, animais altamente agressivos; AgD, indivíduos agredidos e Har, animais pertencentes a grupos com baixa ou ausente agressividade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na 16ª semana de vida. (*) indica uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os valores médios de DA e 5-HT do grupo Har quando comparados com as outras categorias AgR e AgD. (#) indica uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os valores médios de NE do grupo AgD quando comparados com as outras categorias AgR e Har.

Novamente, no grupo AgD, a concentração de NE ($2,3 \pm 0,1$ ng/mg) foi maior quando comparado com os outros dois grupos (AgR: $0,8 \pm 0,1$ e Har: $0,2 \pm 0,05$ ng/mg).

No hipocampo (Fig. 4) houve uma inversão no perfil dos neurotransmissores com maior concentração de serotonina em todas as categorias. Os animais harmônicos apresentaram níveis de 5-HT superior ($11,2 \pm 1,0$ ng/mg) aos outros grupos AgR ($3,2 \pm 0,2$ ng/mg) e AgD ($5,3 \pm 0,2$ ng/mg). A concentração de DA foi menor somente nos animais altamente agressivos ($0,2 \pm 0,01$ ng/mg) quando comparado com as categorias AgD ($2,9 \pm 0,5$ ng/

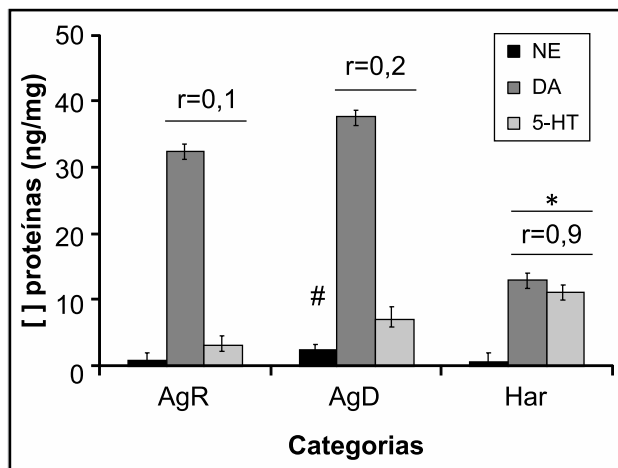


Figura 3: Valores médios dos neurotransmissores – Corpo estriado: Calculamos os valores médios da concentração proteica (ng/mg) da região do corpo estriado. Avaliamos a diferença de concentração de norepinefrina (NE), dopamina (DA) e serotonina (5-HT) entre as categorias: AgR, animais altamente agressivos; AgD, indivíduos agredidos e Har, animais pertencentes a grupos com baixa ou ausente agressividade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na 16ª semana de vida. (*) indica uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os valores médios de DA do grupo Har quando comparados com as outras categorias AgR e AgD. (#) indica uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os valores médios de NE do grupo AgD quando comparados com as outras categorias AgR e Har.

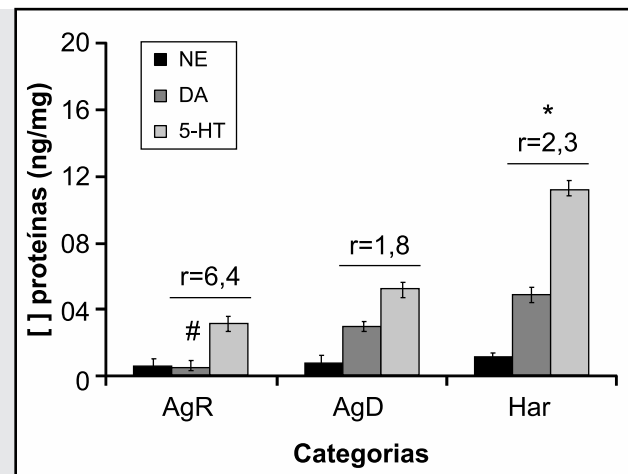


Figura 4: Valores médios dos neurotransmissores – Hipocampo: Calculamos os valores médios da concentração proteica (ng/mg) da região do hipocampo. Avaliamos a diferença de concentração de norepinefrina (NE), dopamina (DA) e serotonina (5-HT) entre as categorias: AgR, animais altamente agressivos; AgD, indivíduos agredidos e Har, animais pertencentes a grupos com baixa ou ausente agressividade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na 16ª semana de vida. (*) indica uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os valores médios de 5-HT do grupo Har quando comparados com as outras categorias AgR e AgD. (#) indica uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os valores médios de DA do grupo AgR quando comparados com as outras categorias AgD e Har.

mg) e Har ($4,5 \pm 0,5$ ng/mg). Neste caso, a relação entre 5-HT/DA foi inversa, mas novamente foi maior a diferença entre esses neurotransmissores nos animais AgR ($r=6,4$) do que nos indivíduos AgD ($r=1,8$) e Har ($r=2,3$). Não observamos diferença significativa na concentração de NE entre os grupos estudados nesta região cerebral.

No córtex pré-frontal (Fig. 5) os animais altamente agressivos demonstram um aumento de aproximadamente 85% dos níveis de DA ($37,5 \pm 1,0$ ng/mg) em relação aos animais har-

mônicos ($5,6 \pm 0,2$ ng/mg). Também é significativamente superior a concentração desse neurotransmissor quando comparado com a categoria AgD ($10,1 \pm 1,0$ ng/mg). Além disso, a relação entre serotonina e dopamina nos animais AgR é extremamente diferente. Os animais agressores apresentam um r com valor de 0,1 enquanto os animais agredidos demonstram $r=0,3$ e os harmônicos $r=0,8$. Não observamos diferença significativa nas concentrações de NE e 5-HT entre os grupos estudados nesta região cerebral.

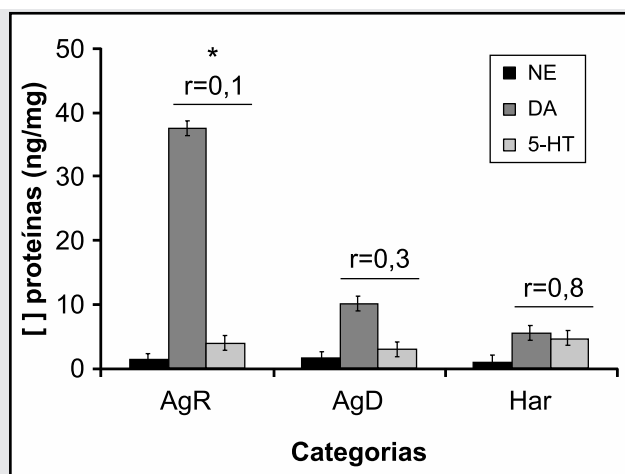


Figura 5: Valores médios dos neurotransmissores – Córtex pré-frontal: Calculamos os valores médios da concentração proteica (ng/mg) da região do córtex pré-frontal. Avaliamos a diferença de concentração de norepinefrina (NE), dopamina (DA) e serotonina (5-HT) entre as categorias: AgR, animais altamente agressivos; AgD, indivíduos agredidos e Har, animais pertencentes a grupos com baixa ou ausente agressividade por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na 16ª semana de vida. (*) indica uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os valores médios de DA do grupo AgR quando comparados com as outras categorias AgD e Har.

4 DISCUSSÃO

Em animais, vários estudos etológicos relacionam a agressividade ao caráter ontogenético e a adaptabilidade filogenética deste tipo de comportamento^{20,21,22}. Desde 1960 podemos observar um estudo sistemático do comportamento de camundongos (e outros modelos animais) em ambiente laboratorial²³. Em relação a(s) causa(s) da agressividade nos animais de laboratório ainda não há um consenso. Há uma complexa rede de fatores relacionados a genética²⁴, bioquímica^{25,26}, fisiologia^{27,28,29}, neuroanatomia (neurotransmissores)^{30,31} que determinam a presença de episódios agressivos entre os indivíduos de um determinado grupo.

Em nosso biotério, estruturamos o Modelo de Agressividade Espontânea (MEA)⁸. Esse modelo demonstrou ser eficaz na reprodutibilidade da identificação e avaliação do surgimento de agressividade em grupos de camundongos da linhagem Swiss Webster, machos e em idade adulta⁸. Nossos resultados demonstram que nesse reagrupamento houve aproximadamente 10% de grupos que não apresentavam agressividade e que apenas 30% apresentavam alta agressividade⁸. Essas observações nos fez refletir, pois se a agressividade é um comportamento animal evolutivamente adaptativo, porquê alguns indivíduos, ou alguns grupos, apresentam alta agressividade e outros não apresentam PCA?

Acreditamos que através de uma complexa combinação de fatores genéticos e ambientais (manejo) os animais sofram de algum tipo de transtorno psiquiátrico, desta forma comprometendo o controle da agressividade em alguns indivíduos. Nossos resultados preliminares demonstram que os animais *anxiety-like* (são mais agressivos que os indivíduos com valores médios ou hipoativos (*depression-like*) de atividade medidos pelo TSC^{7,8}. Também destacamos a possibilidade de algum trauma, em idade precoce, do desenvolvimento de um Transtorno de Estresse Pós Traumático (TEPT) e a presença de agressividade exacerbada durante a idade adulta¹².

Estamos buscando esclarecer a(s) causa(s) genéticas, fisiológicas, reprodutivas e neurológicas deste comportamento altamente agressivo nos camundongos Swiss Webster, machos, reagrupados na idade adulta. Nesse trabalho detalhamos a concentração de NE, DA e 5H-T em diversas áreas cerebrais. Nossos resultados demonstram que os animais altamente agressivos apresentam maior concentração de DA e uma menor expressão de 5-HT em relação as outras categorias na média de todas as regiões cerebrais estudadas. Além disso, a diferença entre esses dois neurotransmissores é maior quando comparada com os grupos AgD e Har. Nas áreas específicas, observamos o aumento significativo de DA nas regiões do corpo estriado e do córtex pré-frontal e diminuição na amígdala e hipocampo. Em relação a serotonina, esses ani-

mais (AgR) apresentam concentrações inferiores na amígdala, corpo estriado e hipocampo, sendo que nessa última área, observamos uma relação inversa de 5-HT/DA, pois os valores da concentração de serotonina são mais elevados em todas as categorias. De forma geral, a NE está mais elevada nos animais AgD, porém na amígdala o valor deste neurotransmissor está mais baixo do que as outras categorias nos animais agredidos.

A DA e a expressão dos seus respectivos receptores estão envolvidos em diversas patologias como a doença de Parkinson^{32,33}, esquizofrenia³⁴, psicoses³⁵ e dependência química a drogas³⁶. Nesse trabalho somente avaliamos a concentração da própria DA e em diferentes áreas cerebrais. Desta maneira, sugerimos que os animais altamente agressivos apresentam um comprometimento na função da amígdala, aumentando sua tensão e o seu medo³⁷. Essas emoções (e consequentemente a agressividade) também parecem estar exacerbadas pelo excesso de DA no corpo estriado e no córtex pré-frontal. Nesse último, que é a parte anterior do lobo frontal do cérebro, localizado anteriormente ao córtex motor primário e ao córtex pré-motor³⁸. Sua atuação está relacionada ao planejamento de comportamentos, expressão da personalidade, tomadas de decisões e modulação de comportamento social³⁸. Consequentemente com os níveis aproximadamente 85% maior de DA nessa região, podemos supor que essa excessiva expressão possa ser uma das explicações para o descontrole da agressividade. Além disso, Sua estimulação excessiva resulta em dessensibilização dos receptores gerando maior necessidade de dopamina para obter o mesmo efeito³⁹. Esse mecanismo tem um papel importante na dependência química, sensação de prazer e recompensa³⁹. Então, podemos sugerir que a violência gera prazer ao animal agressor e a agressividade é escalada, pois há a busca comportamental para o aumento contínuo da DA. A serotonina, também apresenta uma variada gama de ações dependente da via de receptores (5-HT_{1a}). Podemos destacar transtornos como, depressão, ansiedade, TEPT e esquizofrenia⁴⁰. Em nosso caso sugerimos que a agressividade esteja relacionada a diminuição, de forma geral, dos níveis desse neurotransmissor e

também da diferença na relação entre o 5-HT e a DA, nas diferentes áreas cerebrais. Finalmente, a NE está relacionada ao mecanismo de luta/fuga a estímulos estressores⁴¹. É coerente observar que os animais AgD apresentem, de forma geral, aumento da concentração desse neurotransmissor, pois a subordinação despótica é exercida sob severas e contínuas agressões. Ressaltamos que na amígdala, o nível de NE está mais baixo (em comparação aos grupos AgR e Har e os neurotransmissores Da e 5-HT), sugerindo que a tensão e o medo nesses animais também esteja mais elevado³⁷.

5 CONCLUSÕES

Nossos resultados descrevem um superficial painel da complexa rede de neurotransmissão e neuromodulação dos impulsos nervosos nos camundongos. Estamos convictos que há a necessidade de maior profundidade no estudo destas intrincadas vias de sinalizações neurológicas. Contudo, a partir da nossa abordagem podemos sugerir que os animais Swiss Webster (machos) altamente agressivos, quando reagrupados em idade adulta, possuem um significativo desequilíbrio da concentração dos neurotransmissores, principalmente de DA e na região do córtex pré-frontal. Além disso, a diferença entre a 5-HT/DA é maior nesses animais em todas as regiões cerebrais. Concluímos que a alta agressividade nos camundongos está relacionada a incapacidade do animal controlar essa atitude e que passa a sentir a necessidade (ou o prazer) de realizar os episódios agressivos de forma intensa e escalada (intensidade gradativa).

AGRADECIMENTOS

À Dr^a Maria de Nazaré Corrêa Soeiro, Chefe do Laboratório de Biologia Celular/IOC pelo apoio logístico para os ensaios e da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

DESCRIPTION BY HPLC TO THE CONCENTRATION OF NOREPINEPHRINE, SEROTONIN AND DOPAMINE IN VARIOUS BRAIN REGIONS OF HIGHLY AGGRESSIVE SWISS WEBSTER MICE

ABSTRACT

The mice of the Swiss Webster lineage demonstrate a varied and complex individual and social behavior. In adulthood, tend to establish the dominance hierarchy (with the presence of aggression with diversify intensity) and demand territorialism and exclusivity for mating. In 30% of regroupings of males in adulthood observed the presence of highly aggressive dominant individuals. Our goal in this work and describe the concentration of neurotransmitters such as: a) Norepinephrine (NE); b) Dopamine (DA) and c) serotonin (5-HT) in respective brain regions: a) Amygdala; b) Striatum, c) Hippocampus d) Prefrontal cortex. We performed this procedure for HPLC in different categories such as: AgR, highly aggressive; AgD, beaten and Har, harmonics. Our results demonstrate that the group AgR the concentration of DA is 85% higher than the Har and the group was greater difference in the 5-HT/DA most studied categories. In conclusion, the highly aggressive behavior of Swiss Webster mice, males and reassembled in adulthood is related to the imbalance of neurotransmitters, especially the DA in the prefrontal cortex. CEUA/FIOCRUZ LW-5/12

Key Words: Mice. Swiss Webster. Aggressive Behaviour. Neurotransmitters.

REFERÊNCIAS

1. Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. Manejo de Camundongos. In Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS (eds) Animais de laboratório: criação e experimentação. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002. p. 387-8.
2. Ko GM, De Luca RR. Camundongo. In Lapchik V, Mattaraia V, Ko G. (eds) Cuidados e manejos de animais de laboratório. 1ª ed. São Paulo: Editora Ateneu; 2009. p. 137-67.
3. Moreira VB. Manejo Reprodutivo de Camundongos. In Mattaraia VM & Oliveira GM (orgs) Comportamento de Camundongos em Biotério. 1ª ed. São Paulo: Editora Poloprint.; 2012. p. 58-67.
4. Fox GM, Cohen JB, Franklin ML. Mice. In: Fox GM, Cohen JB, Franklin ML (eds) Laboratory Animal Medicine. 3ª ed. New York: Academic Press; 1984. p.1-10.
5. Rodrigues FVB, Kuzel MA, Oliveira FS, Demarque KC, Rangel JA, Batista WS, da Silva LCM, Gameiro LS, Oliveira GM. Etograma de camundongos em biotério II: Quais são as principais diferenças no comportamento de Swiss Webster e Balb/c? RESBCAL. 2013 Dec; 1(4): 136-46.
6. Kuzel MA, Oliveira FS, Demarque KC, Rangel JA, Rodrigues FVB, Batista WS, Gameiro LS, Oliveira GM. Estudo da hierarquia de camundongos Swiss Webster através do uso de Sistemas com Gaiolas Interligadas (SGI). RESBCAL. 2013 Ago; 2(1): 49-60.
7. Oliveira FS, Rodrigues FVB, Demarque KC, Rangel JA, Batista WS, Alvarenga TA, Gameiro LS, Oliveira GM. Characterization of dominant and subordinate social status and the hierarchy structure for Swiss Webster mice. RESBCAL. 2013 Dec; 2(2): 136-146.
8. Batista WS, Pereira da Silva LCC, Demarque KC, de Oliveira FS, Acquarone M, Rodrigues FVB, Oliveira GM. Estudo do comportamento agressivo de camundongos em biotério: Aplicação do Modelo Espontâneo de Agressividade (MEA). RESBCAL. 2012 Dec; 1(4): 46-51.
9. Brodtkin ES, Goforth SA, Keene AH, Fossella JA, Silver LM. Identification of quantitative trait Loci that affect aggressive behavior in mice. J Neurosci. 2002 Feb; 22(3):1165-70
10. Kikusui T, Isaka Y, Mory Y. Early weaning deprives mouse pups of maternal care and decreases their maternal behavior in adulthood. Behav Brain Res. 2005 Dec; 1(4): 25-9.

11. Rentesi G, Antoniou K, Marselos M, Syrrou M, Papadopoulou-Daifoti Z, Konstandi M. Early maternal deprivation-induced modifications in the neurobiological, neurochemical and behavioral profile of adult rats. *Behav Brain Res.* 2013 Mai; 1(244):29-37.
12. Mattos P. A. Psiconeuroendocrinologia. In Fiskis JP & Mello MF (Orgs) *Transtorno de Estresse Pós Traumático*. 1ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2012. p.123-45.
13. McKinney WT. Basis of development of animal models in psychiatry: an overview. In Koob GF, Ehlers CL, Kupfer DJ. (eds) *Animal Models of Depression*. Boston: MA-Birkhäuser; 1989. p.3-17.
14. Steimer D. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. *Dialogues Clin Neurosci.* 2011 13(4):495-506.
15. Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety *Nat Rev Drug Discov.* 2005 Sep; 4(9):775-90.
16. Haller J. The neurobiology of aggression-a review of hypothalamic mechanisms in cats, rodents, and humans. *Brain Res Bull.* 2013 Apr; 93(7):97-109.
17. Andrews NA, Papakosta M, Barnes NM. Discovery of novel anxiolytic agents-the trials and tribulations of pre-clinical models of anxiety. *Neurobiol Dis.* 2014 Jan; 61(5):72-8.
18. Celada P, Bortolozzi A, Artigas F. Serotonin 5-HT1A receptors as targets for agents to treat psychiatric disorders: rationale and current status of research. *CNS Drugs.* 2013 Sep; 27(9):703-16.
19. Nestler EJ. Epigenetic mechanisms of depression. *JAMA Psychiatry.* 2014 Apr 71(4):454-6.
20. Blanchard RJ, Hori K, Blanchard DC. Social dominance and individual aggressiveness. *Aggress Behav.* 1988 Feb; 14(1): 195-203.
21. Yerkes RM. The heredity of savageness and wildness in rats. *J Anim Behav.* 1913 Mai; 3(1): 286-96.
21. Pellis SM, Pellis VC. Identification of the possible origin of the body target that differentiates play fighting from serious fighting in Syrian Golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Aggress Behav.* 1988 Mai; 14(3): 437-50.
22. Koob GF, McKinney WT. Basis of development of animal models in psychiatry: an overview. In Koob GF, Ehlers CL, Kupfer DJ. (eds) *Animal Models of Depression*. Boston: MA-Birkhäuser; 1989. p.3-17.
23. Brodtkin ES, Goforth SA, Keene AH, Fossella JA, Silver LM. Identification of quantitative trait Loci that affect aggressive behavior in mice. *J Neurosci.* 2002 Fev; 22(3):1165-70.
24. Edwards DA, Nahai FR, Wright P. Pathways linking the olfactory bulbs with the medial preoptic anterior hypothalamus are important for intermale aggression in mice. *Physiol Behav.* 1993 Mar; 53(3):611-5.
25. Liebenauer LL, Slotnick BM. Social organization and aggression in a group of olfactory bulbectomized male mice. *Physiol Behav.* 1996 Ago; 60(2):403-9.
26. Craig IW. Genetic polymorphisms in stress response. In Fink G (ed) *Encyclopedia of Stress*. 2ª ed. Oxford: Elsevier; 2007.p. 135-40.
27. Bray PJ, Cotton RG. Variations of the human glucocorticoid receptor gene (NR3C1): pathological and in vitro mutations and polymorphisms. *Hum Mutat.* 2003 Mai; 2(21):557-68.
28. Virkkunen M, Rissanen A, Naukkarinen H, Franssila-Kallunki A, Linnoila M, Tiihonen J Energy substrate: metabolism among habitually violent alcoholic offenders having antisocial personality disorder. *Psychiatry Res* 2007 Ago; 150(3):287-95.
29. Birger M, Swartz M, Cohen D, Alesh Y, Grishpan C, Kotler M. Aggression: the testosterone-serotonin link. *Isr Med Assoc J.* 2003 Set; 5(1):653-8.
30. Coccaro EF, Kavoussi RJ, Trestman RL, Gabriel SM, Cooper TB, Siever LJ. Serotonin function in human subjects: intercorrelations among central 5-HT indices and aggressiveness. *Psychiatry Res.* 1997 Set; 73(2):1-14.
31. Muroyama A. An alternative medical approach for the neuroprotective therapy to slow the progression of Parkinson's disease. *Yakugaku Zasshi.* 2013 Jul; 133(8):849-56.
32. Morin N, Jourdain VA, Di Paolo T. Modeling dyskinesia in animal models of Parkinson disease. *Exp Neurol.* 2014 Jun; 256:105-116.
33. Kuepper R, Skinbjerg M, Abi-Dargham A. The dopamine dysfunction in schizophrenia revisited: new insights into topography and course. *Handb Exp Pharmacol.* 2012 Mar; 4(212):1-26.
34. McKinzie DL, Bymaster FP. Muscarinic mechanisms in psychotic disorders. *Handb Exp Pharmacol.* 2012 Jul; 5(213):233-65.
35. Gorwood P, Le Strat Y, Ramoz N, Dubertret C, Moalic JM, Simonneau M. Genetics of dopamine receptors and drug addiction. *Hum Genet.* 2012 Jun; 131(6):803-22.
36. Duvarci S, Pare D. Amygdala Microcircuits Controlling Learned Fear. *Neuron.* 2014 Jun; 82(5):966-80.
37. Bari A, Robbins TW. Inhibition and impulsivity: behavioral and neural basis of response control. *Prog Neurobiol.* 2013 Sep; 108(4):44-79.
38. Blum K, Chen AL, Giordano J, Borsten J, Chen TJ, Hauser M, Simpatico T, Femino J, Braverman ER, Barh D. The addictive brain: all roads lead to dopamine. *J Psychoactive Drugs.* 2012 Apr-Jun; 44(2):134-43.
39. Celada P, Bortolozzi A, Artigas F. Serotonin 5-HT1A receptors as targets for agents to treat psychiatric disorders: rationale and current status of research. *CNS Drugs.* 2013 Sep; 27(9):703-16.
40. Itoi K, Sugimoto N. The brainstem noradrenergic systems in stress, anxiety and depression. *J Neuroendocrinol.* 2010 May; 22(5):355-61.