



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE TEORIA E PESQUISA DO COMPORTAMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E
COMPORTAMENTO

**Papel do sistema nitrérgico em respostas tipo ansiedade decorrentes de estresse agudo
por substância de alarme coespecífica em *zebrafish* (*Danio rerio*, Hamilton, 1822)**

João Alphonse Apóstolo Heymbeeck

BELÉM – PA

Março - 2026

**Papel do sistema nitrérgico em respostas tipo ansiedade decorrentes de estresse agudo
por substância de alarme coespecífica em *zebrafish* (*Danio rerio*, Hamilton, 1822)**

João Alphonse Apóstolo Heymbeeck

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Neurociências e Comportamento da Universidade
Federal do Pará, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre(a) em Neurociências e
Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Caio Maximino de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Rachel Coelho Ripardo.

BELÉM – PA

Março - 2026

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

UFPA/Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento/Biblioteca

H618p Heymbeeck, João Alphonse Apóstolo, 2000-

Papel do sistema nitrérgico em respostas tipo ansiedade decorrentes de estresse agudo por substância de alarme coespecífica em *zebrafish* (*Danio rerio*, Hamilton, 1822). / João Alphonse Apóstolo Heymbeeck. — 2026.

101p.: il. color

Orientador: Caio Maximino de Oliveira

Coorientadora: Rachel Coelho Ripardo

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento, Programa de Pós-Graduação em Neurociência e Comportamento, Belém, 2026.

1. Neurociência e comportamento. 2. Pesquisa Experimental. 3. Zebrafish. 4. Comportamento defensivo. 5. Estresse agudo. 6. Transmissor gasoso. 7. Análise de rede. 8. Óxido nítrico. I. Título.

CDD - 23. ed. 150.77

Catalogação na Fonte: Maria Célia Santana da Silva – CRB2/780

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – 88887.139407/2025-00 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - 423735/2016-0

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – 88887.139407/2025-00 and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - 423735/2016-0.

Agradeço à CAPES pelo apoio em forma de bolsa de estudos (Processo 88887.139407/2025-00), essencial ao desenvolvimento do presente trabalho.

João Alphonse Apóstolo Heymbeeck, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento da Universidade Federal do Pará, Belém-PA, Brasil.

Contato: João Alphonse Apóstolo Heymbeeck.

E-mail: joao.heybeeck@gmail.com

**Papel do sistema nitrérgico em respostas tipo ansiedade decorrentes de estresse agudo
por substância de alarme coespecífica em *zebrafish* (*Danio rerio*, Hamilton, 1822)**

João Alphonse Apóstolo Heymbeeck

Data de aprovação: 25/03/2026

Banca examinadora:

Prof. Dr. Caio Maximino de Oliveira – UNIFESSPA (presidente)

Prof^ª Dr^ª Rachel Coelho Ripardo Teixeira – UFPA (vice-presidente)

Prof^ª Dr^ª Carla Cristina Paiva Paracampo – UFPA (membro interno)

Prof^ª Dr^ª Monica Gomes Lima-Maximino – UEPA (membro externo)

**Termo de Autorização e Declaração de Distribuição não exclusiva para Publicação
Digital no Repositório Institucional da UFPA**

IDENTIFICAÇÃO DO AUTOR E DA OBRA

Autor*: João Alphonse Apóstolo Heymbeeck

Vínculo com a UFPA: () Servidor; (X) Discente

Unidade: Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento

Sub Unidade: Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento

Tipo do documento: () Tese; (X) Dissertação; () Livro; () Capítulo de Livro; () Artigo de Periódico; () Trabalho de Evento; () Outro.
Especifique: _____

Título do Trabalho: Papel do sistema nitrérgico em respostas tipo ansiedade decorrentes de estresse agudo por substância de alarme coespecífica em *zebrafish* (*Danio rerio*, Hamilton, 1822)

Data da Defesa: 25 /03 /2026 Área do Conhecimento: Neurociências e Comportamento

Linha de Pesquisa: Processos Comportamentais Básicos Agência de Fomento: CAPES

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO EXCLUSIVA

O referido autor:

Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à Universidade Federal do Pará os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros, está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal do Pará, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

TERMO DE AUTORIZAÇÃO

Na qualidade de titular dos direitos de autor da publicação, autorizo a UFPA a disponibilizar de acordo com a licença pública Creative Commons Licença 3.0 Unported, e de acordo com a Lei nº 9610/98, o texto integral da obra citada, conforme permissões abaixo por mim assinaladas, para fins de leitura, impressão e/ou download, a partir desta data.

Permitir o uso comercial da obra?

☐ Sim

☒ Não

Permitir modificações em sua obra?

☐ Sim, contanto que compartilhem pela mesma licença

☒ Não

O documento está sujeito ao registro de patente?

☐ Sim

☒ Não

A obra continua protegida conforme a Lei de Direito Autoral.

Belém (PA), 16/04/2026

 Documento assinado digitalmente
JOAO ALPHONSE APOSTOLO HEYMBEECK
Data: 16/04/2026 17:49:17-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dedico à minha mãe, Normeleide Apóstolo,
por ser inspiração e fortaleza, e por me ensinar
a enfrentar as dificuldades com serenidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores, prof. Dr. Caio Maximino e profa. Dra. Rachel Ripardo, pelo direcionamento durante a realização do presente trabalho e por serem importantes inspirações profissionais.

À professora Dra. Monica Lima-Maximino, por me direcionar ao mestrado sob orientação do professor Caio e por disponibilizar seu laboratório para que eu pudesse estagiar e realizar parte dos experimentos desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Neurofarmacologia e Biofísica da Universidade do Estado do Pará, Gabrielly Ribeiro, Lara Nathielly, Nicolý Dias, Naielly Cardoso e Kauan Mohamad, pelo apoio durante a realização dos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Neurociências e Comportamento da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, pelo apoio relacionado aos cuidados com os animais e pela disponibilização de materiais de experimento, e do Laboratório de Neuroengenharia da Universidade Federal do Pará, pelo apoio na realização dos experimentos de histoquímica.

À CAPES, pelo apoio em forma de bolsa de estudos.

Heymbeeck, J. A. A. (2026). Papel do sistema nitrérgico em respostas tipo ansiedade decorrentes de estresse agudo por substância de alarme coespecífica em *zebrafish* (*Danio rerio*, Hamilton, 1822). Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento. Belém-PA, 102 p.

RESUMO

Um dos diversos sistemas que participam da modulação de respostas de ansiedade é o sistema nitrérgico, que parece fundamental para que a sinalização por diversos neurotransmissores seja efetiva em possibilitar os ajustes comportamentais e fisiológicos observados em modelos relevantes para a psiquiatria biológica. Assim, com base na necessidade básica de entender os mecanismos proximais subjacentes a respostas relacionadas à ansiedade, o presente trabalho objetivou avaliar a participação do sistema nitrérgico em respostas tipo ansiedade decorrentes de exposição aguda à substância de alarme co-específica (CAS) em *zebrafish*. Para isso, 135 peixes da espécie *Danio rerio* (Hamilton, 1822) adultos foram utilizados. Destes, 39 foram doadores de CAS, enquanto 72 foram subdivididos em grupos de 12 animais com diferentes especificações experimentais para a avaliação de variáveis comportamentais e bioquímicas, e 24 foram utilizados para a análise histoquímica. Os animais foram tratados com 7-NI (10 ou 30 mg/kg), uma droga inibidora da enzima óxido nítrico sintase 1 (NOS-1), ou veículo. Após a administração da droga, foram individualmente expostos à CAS ou à água destilada (AD). Em seguida, foram submetidos ao teste de distribuição vertical eliciada pela novidade (DVEN) e, posteriormente, ao teste de preferência claro-escuro (PCE). Após a realização dos testes, os encéfalos dos animais foram dissecados para a quantificação dos níveis de nitrito e de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) por espectrofotometria. Para o experimento de histoquímica, grupos de 6 animais foram expostos à CAS ou à água destilada e, em seguida, submetidos à dissecação para a realização de cortes histológicos e marcações histoquímicas. Como resultados, o bloqueio de NOS-1 por ambas as doses de 7-NI parece ter produzido um maior estado de respostas tipo ansiedade tanto nos animais expostos à AD

quanto naqueles expostos à CAS, sendo a dose de 10 mg/kg responsável por um estado intermediário entre o controle e o efeito observado com a dose de 30 mg/kg. Bioquimicamente, a inibição de NOS-1 parece ter exercido efeito antagônico para as diferentes doses de 7-NI sobre as concentrações de nitrito e de TBARs, a diminuição nos níveis de nitrito com a menor dose de 10 mg/kg parece estar associada ao aumento nas concentrações de TBARs, enquanto o aumento nos níveis de nitrito com a dose de 30 mg/kg esteve associado à diminuição das concentrações de TBARs. Quanto à histoquímica, a exposição à CAS leva a uma maior atividade nitrérgica no telencéfalo dorsomedial, telencéfalo supracomissural, área pré-óptica, telencéfalo pós-comissural, habenulas dorsal e ventral, grisea central, e rafe superior, enquanto menor atividade é observada no telencéfalo dorsolateral e teto óptico. No geral, a isoforma NOS-1 parece viabilizar a produção de NO responsável por modular respostas tipo ansiedade frente ao estresse agudo por CAS em *zebrafish*, e isso inclui diferentes ajustes comportamentais e bioquímicos, sejam eles direcionados à ansiogênese ou à ansiólise. Além disso, a exposição à CAS leva à alteração dos padrões de atividade em regiões encefálicas associadas a circuitos de defesa, sendo marcada, funcionalmente, pelo aumento da centralidade do *locus coeruleus* associado à diminuição da centralidade da rafe. Nesse sentido, estudos posteriores devem investigar o impacto de possíveis ações tônicas e fásicas da sinalização nitrérgica sobre respostas de defesa, bem como a influência do sexo, da relevância da ameaça, da controlabilidade do estresse, da duração do estresse e do contexto social nessas respostas em *zebrafish*.

Palavras-chave: Comportamento defensivo; estresse agudo; transmissor gasoso; análise de rede; óxido nítrico.

Heymbeeck, J. A. A. (2026). Role of the nitrenergic system in anxiety-like responses induced by acute exposure to conspecific alarm substance in zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton, 1822). Master's Thesis. Postgraduate Program in Neuroscience and Behavior. Belém-PA, 102 p.

ABSTRACT

The nitrenergic system is one of the key modulators of anxiety-like responses, playing a fundamental role in enabling effective signaling by various neurotransmitters to facilitate the behavioral and physiological adjustments observed in relevant models of biological psychiatry. Driven by the fundamental need to understand the proximal mechanisms underlying anxiety-related responses, this study aimed to evaluate the involvement of the nitrenergic system in anxiety-like behaviors resulting from acute exposure to conspecific alarm substance (CAS) in adult zebrafish (*Danio rerio*). A total of 135 adult fish were used. Of these, 39 served as CAS donors, 72 were subdivided into groups of 12 animals under different experimental conditions for behavioral and biochemical assessments, and 24 were used for histochemical analysis. Animals were treated with either 7-NI (10 or 30 mg/kg), an inhibitor of nitric oxide synthase 1 (NOS-1), or vehicle. Following drug administration, fish were individually exposed to CAS or distilled water. Subsequently, they were subjected to the novel tank test (NTT) and then to the light-dark preference test (LDT). After behavioral testing, brains were dissected for spectrophotometric quantification of nitrite levels and thiobarbituric acid reactive species (TBARS). For the histochemistry experiment, groups of 6 animals were exposed to CAS or distilled water, then dissected for histological sectioning and histochemical staining. The results indicated that NOS-1 blockade with both doses of 7-NI appeared to potentiate anxiety-like responses in animals exposed to both distilled water and CAS, with the 10 mg/kg dose producing an intermediate state between the control and the effect observed with the 30 mg/kg dose. Biochemically, NOS-1 inhibition exerted opposing effects depending on the 7-NI dose on nitrite and TBARS concentrations; the decrease in nitrite levels with the lower 10 mg/kg dose was associated with increased TBARS

concentrations, whereas the increase in nitrite with the 30 mg/kg dose was linked to decreased TBARS concentrations. Histochemical analysis revealed that CAS exposure leads to increased nitroergic activity in brain regions including the dorsomedial telencephalon, supracommissural telencephalon, preoptic area, postcommissural telencephalon, dorsal and ventral habenulae, griseum centrale, and superior raphe, while decreased activity was observed in the dorsolateral telencephalon and optic tectum. Overall, the NOS-1 isoform appears to enable the production of NO that modulates anxiety-like responses following acute CAS stress in zebrafish, encompassing distinct behavioral and biochemical adjustments directed toward both anxiogenic and anxiolytic outcomes. Furthermore, CAS exposure alters activity patterns in brain regions associated with defensive circuits, functionally marked by an increased centrality of the locus coeruleus coupled with decreased centrality of the raphe nuclei. Future studies should investigate the impact of potential tonic and phasic actions of nitroergic signaling on defensive responses, as well as the influence of sex, threat relevance, stress controllability, stress duration, and social context on these responses in zebrafish.

Keywords: Defensive behavior; acute stress; gaseous transmitter; network analysis; nitric oxide.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – <i>Representação das Vias de Sinalização Nitrérgicas no Sistema Nervoso Central</i>	22
Figura 2 – <i>Ilustração de Cortes Coronais de um Cérebro de Peixe Teleósteo Demonstrando Estruturas Relacionadas aos Circuitos de Defesa</i>	27
Figura 3 – <i>Circuitos de Defesa Relacionados à Detecção, à Identificação, ao Processamento e à Seleção de Respostas a Ameaças em Encéfalo de Peixes Teleósteos</i>	29
Figura 4 – <i>Delineamento Experimental: Comportamento e Bioquímica</i>	40
Figura 5 – <i>Delineamento Experimental: Histoquímica</i>	41
Figura 6 – <i>Zebrafish do Fenótipo longfin</i>	43
Figura 7 – <i>Delineamento dos Grupos Experimentais e Etapas</i>	45
Figura 8 – <i>Obtenção da CAS e Exposição dos Animais</i>	47
Figura 9 – <i>Aparato para o Teste de DVEN</i>	48
Figura 10 – <i>Aparato para o Teste de PCE</i>	50
Figura 11 – <i>Efeito da Inibição de NOS-1 por 10 ou 30 mg/kg de 7-NI em Animais Expostos ao Controle ou à Substância de Alarme Coespecífica e Submetidos ao Teste de Distribuição Vertical Eliciada pela Novidade</i>	57
Figura 12 – <i>Efeito da Inibição de NOS-1 por 10 ou 30 mg/kg de 7-NI em Animais Expostos ao Controle ou à Substância de Alarme e Submetidos ao Teste de Preferência Claro-Escuro</i>	59
Figura 13 – <i>Efeito da Inibição de NOS-1 por 10 ou 30 mg/kg de 7-NI sobre os Níveis de Nitrito e de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico em Animais Expostos ao Controle ou</i>	

à	Substância	de
Alarme.....		61

Figura 14 – Efeito da Exposição Aguda à Substância de Alarme Coespecífica sobre a Ativação Neurônios Nitrérgicos Marcados por NADPH-diaforase e Mensurados por Densidade

Óptica.	62
--------------	----

Figura 15 – Efeito da Exposição Aguda à Substância de Alarme Coespecífica sobre a Ativação de Neurônios Nitrérgicos Marcados por NADPH-diaforase e Mensurados por Densidade

Óptica.	63
--------------	----

Figura 16 – Medidas de Centralidade Obtidas a Partir da Correlação entre as Densidades Ópticas das Regiões Marcadas por NADPH-diaforase.....

Figura 17 – Análise de Rede a Partir da Correlação entre os Valores de Densidade Óptica Obtidos das Áreas Marcadas por NADPH-diaforase de Animais Expostos ao Controle.....

Figura 18 – Análise de Rede a Partir da Correlação entre os Valores de Densidade Óptica Obtidos das Áreas Marcadas por NADPH-diaforase de Animais Expostos à Substância de Alarme Cospecífica.

67

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
BLA	Amígdala basolateral
BNST	Núcleo leito da estria terminal
CAS	Substância de alarme coespecífica
CeA	Amígdala central
CNG	Canais iônicos dependentes de nucleotídeos cíclicos
CRF	Fator Liberador de Corticotrofina
dHb	Habenula dorsal
DI	Núcleo lateral do telencéfalo dorsal
dIPAG	Grísea periaquedutal dorsolateral
Dm	Núcleo medial do telencéfalo dorsal
DR	Rafe dorsal
DRN	Núcleo dorsal da rafe
EEG	Eletroencefalograma
EROs	Espécies reativas de oxigênio
fMRI	Ressonância magnética funcional
GC	Grísea central
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GTP	Guanosina trifosfato
Hb	Habenula
Hc	Hipotálamo caudal

HCN	Canais modulados por nucleotídeos e ativados por hiperpolarização
HHa	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HO[•]	Radical hidroxila
IKV_{Ca}	Correntes de potássio ativadas por cálcio
ISRSs	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
LaNeC	Neurociências e Comportamento
LaNeF	Laboratório de Neurofarmacologia e Biofísica
LC	<i>Locus coeruleus</i>
LH	Núcleo lateral do hipotálamo
MDA	Malondialdeído
MeA	Amígdala medial
MEG	Magnetoencefalograma
MRN	Núcleos medianos da rafe
NAC	N-acetilcisteína
NBT	Nitro-azul tetrazólio
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NO_x⁻	Nitrito e/ou nitrato
O₂⁻	Radical ânion superóxido
OT	Teto óptico
pCPA	DL-para-clorofenilalanina
PKG	Proteína cinase dependente de GMPc
Pmd	Núcleo hipotalâmico pré-mamilar dorsal

POA	Área pré-óptica
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
pPVN	Núcleo paraventricular parvocelular do hipotálamo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Nitroprussiato de sódio
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SR	Rafe
TBARs	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
vHb	Habenula ventral
VI	Núcleo lateral do telencéfalo ventral
Vp	Núcleo pós-comissural do telencéfalo ventral
Vs	Núcleo supracomissural do telencéfalo ventral
Vv	Núcleo ventral do telencéfalo ventral
5-HT	Serotonina

SUMÁRIO

1.1.	INDUÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE A PARTIR DA SUBSTÂNCIA DE ALARME CO-ESPECÍFICA EM ZEBRAFISH	23
1.2.	REDES DE ATIVAÇÃO NEURONAL	32
1.3.	HIPÓTESES E PREVISÕES.....	35
1.4.	JUSTIFICATIVA	36
2.	OBJETIVOS	37
2.1.	OBJETIVO GERAL	37
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3.	MÉTODOS	39
3.1.	DELINEAMENTO DA PESQUISA	39
3.2.	ANIMAIS E ALOJAMENTO	41
3.3.	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	43
3.4.	TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	43
3.5.	EXTRAÇÃO E EXPOSIÇÃO À SUBSTÂNCIA DE ALARME	45
3.6.	DISTRIBUIÇÃO VERTICAL ELICIADA PELA NOVIDADE.....	47
3.7.	PREFERÊNCIA CLARO-ESCURO	49
3.8.	OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO TECIDO PARA A ANÁLISE BIOQUÍMICA 51	
3.9.	QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO E PROTEÍNAS	51
3.10.	QUANTIFICAÇÃO DE TBARs	52
3.11.	PREPARAÇÃO DO TECIDO E MARCAÇÃO DA ATIVIDADE NEURAL POR MEIO DE NADPH-DIAFORASE	53
3.12.	ANÁLISE DE DADOS	55
4.	RESULTADOS	56
4.1.	EFEITOS COMPORTAMENTAIS.....	56
4.2.	ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	60
4.3.	ATIVIDADE DE NADPH-DIAFORASE	61
5.	DISCUSSÃO	68
5.1.	EFEITOS COMPORTAMENTAIS.....	68
5.2.	EFEITOS BIOQUÍMICOS	72
5.3.	EFEITOS SOBRE A ATIVIDADE DA NADPH-DIAFORASE NO CIRCUITO DE DEFESA	76

6. CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS.....	84

Medo e ansiedade compõem o grupo de funções superiores inter-relacionadas conhecido como emoções. Evolutivamente, são respostas de defesa adaptativas para garantir a sobrevivência do indivíduo e da espécie frente a situações que ofereçam perigo (Roxo et al., 2011). No geral, apesar de compartilharem determinados mecanismos e estruturas cerebrais, são respostas fisiológicas e comportamentais distintas; a ansiedade envolve respostas a um perigo em potencial, enquanto o medo envolve respostas a um perigo real (McNaughton & Corr, 2004).

Duas dimensões explicativas amparam o funcionamento dos sistemas de defesa responsáveis por essas respostas; a primeira é categórica, pois observa uma distinção funcional entre comportamentos de evitação e de abordagem a fontes de perigo, enquanto a segunda é graduada, manifestada por uma hierarquia funcional que determina quais os comportamentos apropriados a cada situação com base na distância de defesa percebida da ameaça (McNaughton & Corr, 2004).

Comportamentos de evitação retiram o indivíduo de uma fonte real de perigo, o que se manifesta como respostas de luta ou fuga e está, portanto, relacionado ao medo. Já os comportamentos de aproximação aproximam o indivíduo de uma fonte de perigo a fim de possibilitar a avaliação de risco. Nesse último caso, o perigo é potencial e as manifestações se relacionam à ansiedade (McNaughton & Corr, 2004), resposta adaptativa que prepara o organismo para detectar e lidar com ameaças (Bateson et al., 2011).

Situações de perigo e/ou ameaçadoras em geral são estressores capazes de eliciar respostas de medo e ansiedade. Nesse sentido, tem-se o estresse como importante constructo em estudos dedicados à investigação de tais fenômenos. Como definição básica, o estresse é um estado de ameaça à homeostase do organismo; pode decorrer de fatores intrínsecos ou extrínsecos e envolver estímulos reais ou percebidos. De forma mais objetiva, pode ser

referido como a sobrecarga das capacidades imediatas de resposta a determinado problema ao qual o organismo esteja exposto (Agorastos & Chrousos, 2022).

Com base nisso, respostas de medo e ansiedade foram selecionadas como mecanismos psicológicos evoluídos (*evolved psychological mechanisms*, EPMs) em resposta a contextos estressantes que atuaram como problemas adaptativos durante a história evolutiva (Brase, 2021; Lewis et al., 2021). Em um nível proximal neurobiológico, essas adaptações são instanciadas pelos sistemas moduladores cerebrais – neurotransmissão serotoninérgica, noradrenérgica e dopaminérgica – em circuitos que envolvem o sistema límbico e estruturas associadas (McNaughton & Corr, 2004).

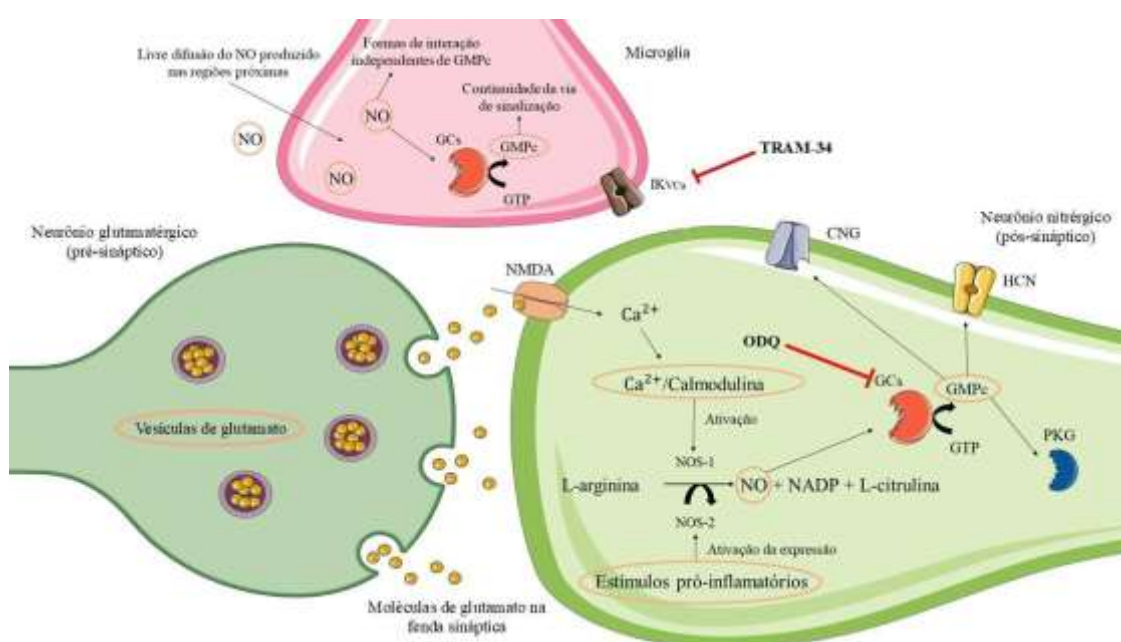
Quanto ao sistema nitrérgico, é caracterizado pelas vias de sinalização celulares que têm como transmissor o óxido nítrico (NO), molécula classificada como gasosa e de meia-vida curta, responsável por atuar como mensageiro intercelular no sistema nervoso central (SNC) por meio de livre difusão pelas membranas. Em vertebrados, forma um sistema de comunicação neural bastante conservado, estando relacionado ao aprendizado e formação de memórias, ao medo, ao sono, ao comportamento reprodutivo e a funções sensoriais e motoras. No geral, também assume outras funções, de acordo com o tecido no qual tenha sido produzido (Garthwaite, 2008; Heymbeeck et al., 2025).

O NO é produzido fisiologicamente através da atividade da óxido nítrico sintase (NOS), enzima catalisadora da reação que forma NO, NADP⁺ e L-citrulina a partir do aminoácido L-arginina. Existem três isoformas de NOS, são elas a NOS-1 ou nNOS – enzima constitutiva e dependente de cálcio – a NOS-2 ou iNOS – independente de cálcio e indutível (produzida em concentrações micromolares frente a estímulos pró-inflamatórios) – e a NOS-3 ou eNOS – constitutiva, dependente de cálcio e bastante relacionada ao endotélio dos diversos sistemas (Garthwaite, 2008; Heymbeeck et al., 2025). Dentre essas vias, a NOS-1 tem início

após a ativação glutamatérgica de receptores NMDA, responsável pelo aumento do influxo de íons cálcio que estimula a produção do NO no neurônio pós-sináptico (**Figura 1**). Os íons cálcio interagem com moléculas de calmodulina, formando complexos capazes de ativar a NOS-1.

Figura 1

Representação das Vias de Sinalização Nitrérgicas no Sistema Nervoso Central



Nota. Ilustração das vias de sinalização nitrérgicas NO-GCs-GMPc e NO-IKVCa. A sinalização glutamatérgica a partir de neurônios pré-sinápticos estimula a produção de óxido nítrico no neurônio pós-sináptico, possibilitando a ação de tal gasotransmissor sobre a guanilato ciclase solúvel, enzima que produz os segundos mensageiros responsáveis por continuar a cascata de sinalização. CNG: canais iônicos dependentes de nucleotídeos cíclicos; GCs: guanilato ciclase solúvel; GMPc: guanosina monofosfato cíclico; GTP: guanosina trifosfato; HCN: canais modulados por nucleotídeos e ativados por hiperpolarização; IKVCa: correntes de potássio ativadas por cálcio; NO: óxido nítrico; NOS-1: óxido nítrico sintase 1;

NOS-2: óxido nítrico sintase 2; PKG: proteína cinase dependente de GMPc. Fonte: Arquivo pessoal (2021).

Para a ação do NO, como ilustrado pela **Figura 1**, o principal receptor é a enzima intracelular guanilato ciclável solúvel (GCs), responsável por catalisar a conversão de trifosfato de guanósina (GTP) em monofosfato de guanósina cíclico (GMPc). A partir de então, o GMPc passa a agir como segundo mensageiro, ativando canais iônicos dependentes de nucleotídeos cíclicos (CNG) por meio de ações agonistas ou regulatórias, direcionando a atividade de canais iônicos modulados por nucleotídeos cíclicos (HCN) através da ativação por hiperpolarização, e ativando a proteína cinase dependente de GMPc (PKG) – responsável por fosforilar diversos substratos. Além dessas, outra forma de sinalização por NO ocorre pela ativação de canais de potássio dependentes de cálcio ou correntes de potássio ativadas por cálcio (IKVCa) (Garthwaite, 2008; Steinert et al., 2010).

A participação do sistema nitrérgico na consolidação da resposta ao estresse é influenciada pelas isoformas constitutiva (NOS-1) e induzível (NOS-2) da enzima NOS. Isso decorre dos diferentes tempos e condições cinéticas necessários à produção do NO por meio dessas isoformas (de Sousa et al., 2024). A NOS-1 atua com produção breve e imediata de NO, enquanto a NOS-2 age com produção contínua e atrasada (Guix et al., 2005). Por esse motivo, espera-se que em uma condição de estresse agudo, diferente daquela em que há consolidação da resposta, seja observada ação da isoforma NOS-1, mas não de NOS-2 (de Sousa et al., 2024).

1.1.INDUÇÃO DO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE A PARTIR DA SUBSTÂNCIA DE ALARME CO-ESPECÍFICA EM ZEBRAFISH

Peixes da espécie *Danio rerio* (Hamilton et al., 1822), popularmente conhecidos como paulistinhas ou *zebrafish*, são importantes organismos para a modelagem em psiquiatria

biológica por apresentarem comportamentos defensivos bem descritos (Kalueff et al., 2013), responsividade a tratamentos farmacológicos e presença de alterações comportamentais e fisiológicas frente à exposição a estressores (de Sousa et al., 2024; Maximino et al., 2010, 2014).

Existe relevante potencial translacional na utilização do *zebrafish*, visto que, diferente de roedores e assim como em humanos, a resposta ao estresse é regulada pelo cortisol e o ciclo circadiano prevê maior pico de atividade durante o dia (Alsop & Vijayan, 2009; Aluru & Vijayan, 2009). Além disso, o seu sistema nitrérgico é suficientemente conservado para que seja utilizado em trabalhos relacionados a outros vertebrados (Holmqvist et al., 2000, 2007; Virgili et al., 2001). Nesse sentido, há grande probabilidade de que os resultados obtidos a partir da utilização de tal organismo em um modelo de estresse agudo reflita parte da realidade das respostas de ansiedade observadas em humanos. O estresse agudo e crônico por substância de alarme co-específica (CAS) elicia, em algum grau, respostas comportamentais tipo medo e/ou ansiedade, estando os sistemas serotoninérgico, glutamatérgico e nitrérgico implicados nessas respostas (de Sousa et al., 2024; Maximino, 2012; Maximino, do Carmo Silva, et al., 2018). Somado a isso, o sistema límbico de mamíferos (Matsushita et al., 2001; Simpson et al., 2003), anfíbios (López et al., 2005) e peixes (Bordieri et al., 2005), é rico em células produtoras de óxido nítrico, evidência que ampara a importância de se investigar o papel desempenhado pela via de sinalização nitrérgica nos processos relacionados.

Uma forma de acessar repostas tipo ansiedade com a utilização do *zebrafish* como organismo modelo é por meio de testes comportamentais. O teste de distribuição vertical eliciada pela novidade (DVEN) é fundamentado na tendência evoluída do animal de apresentar um comportamento defensivo frente a um ambiente desconhecido, onde a procura por proteção se manifesta como preferência pelo fundo do aquário (geotaxia), aumento da

frequência de congelamentos, redução da exploração e aumento dos movimentos erráticos. À medida que o animal se habitua ao aparato teste, tais comportamentos diminuem (Cachat et al., 2010). Entretanto, a exposição a estressores como a CAS evoca comportamentos defensivos com mais intensidade, que são definidos como comportamentos tipo-medo (Egan et al., 2009). Os parâmetros comportamentais descritos podem ser aplicados em modelos de ansiedade com *zebrafish* de forma similar àquela observada com roedores no teste de campo aberto (Cachat et al., 2010).

Outro teste comportamental relevante é o de preferência claro-escuro (PCE). De forma semelhante ao teste de DVEN, também submete o animal a um conflito motivacional caracterizado pela tendência de manifestar um comportamento exploratório natural frente ao novo ambiente, assim como um comportamento defensivo que o mantenha em alerta para possíveis perigos presentes nesse ambiente (Maximino et al., 2010). O aparato para o teste de PCE é metade branco e metade preto. Por representar um ambiente mais seguro, em que a predação é menos provável, é esperado que, naturalmente, mais tempo seja gasto pelos animais no lado escuro, observação que se intensifica em caso de exposição do animal a um estressor que apresente validade para o estudo de comportamentos tipo medo e ansiedade (Maximino et al., 2010). Além disso, parte da resposta comportamental observada no teste é mediada pela via glutamato-óxido nítrico (de Sousa et al., 2024; Herculano et al., 2015), o que enfatiza sua validade para o estudo da participação do sistema nitrérgico em repostas tipo ansiedade.

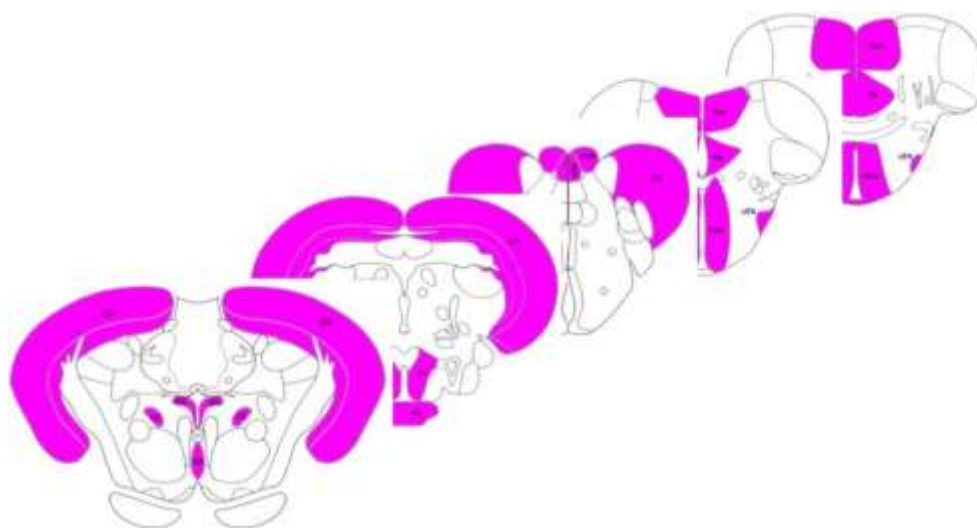
Além da análise comportamental, observações no nível histoquímico possibilitam a avaliação de alterações histológicas das respostas tipo ansiedade. Em mamíferos, circuitos relacionados às respostas de defesa envolvem o sistema sensorial, por meio do qual estímulos aversivos condicionados ou incondicionados são detectados, circuitos amigdalares, associados

à seleção de respostas comportamentais e endócrinas apropriadas e à aprendizagem aversiva, circuitos hipotalâmicos também para respostas comportamentais e endócrinas de defesa, e circuitos mesencefálicos relacionados ao controle do *output* comportamental e fisiológico (LeDoux, 2012). Esses circuitos apresentam correspondentes funcionais e homologias quando comparados aos circuitos de teleósteos como o *zebrafish* (Silva, Lima-Maximino, et al., 2018).

Como ilustrado pela Figura 2, para peixes teleósteos, algumas estruturas associadas a circuitos de defesa se destacam. Entre elas estão o núcleo medial do telencéfalo dorsal (Dm), relacionado ao sistema “límbico associativo” e homólogo como um campo às amígdalas lateral e basolateral de mamíferos (Maximino et al., 2013); os núcleos supracomissural (Vs) e pós-comissural (Vp) do telencéfalo ventral, que são homólogos ao sistema amigdalar “autônômico” (Maximino et al., 2013), sendo Vs parcialmente homólogo ao núcleo leito da estria terminal (BNST) e à amígdala medial (O’Connell & Hofmann, 2011); o núcleo lateral do telencéfalo dorsal (Dl), homólogo ao hipocampo (Goodson & Kingsbury, 2013); e a área pré-óptica (POA), homóloga a núcleos hipotalâmicos compostos pelos grupos magno- e gigantocelulares (homólogos do núcleo supraóptico) e pelo grupo de neurônios parvocelulares (homólogo ao núcleo paraventricular) (Goodson & Kingsbury, 2013; Moore & Lowry, 1998).

Figura 2

Ilustração de Cortes Coronais de um Cérebro de Peixe Teleósteo Demonstrando Estruturas Relacionadas aos Circuitos de Defesa



Nota. A ilustração indica as regiões encefálicas, em corte frontal, relacionadas a circuitos de defesa em peixes teleósteos. Dm: núcleo medial do telencéfalo dorsal; Vs: núcleo supracomissural do telencéfalo ventral; Vv: núcleo ventral do telencéfalo ventral; Vl: núcleo lateral do telencéfalo ventral; Hb: habenula; POA: área pré-óptica; Hc: hipotálamo caudal; OT: teto óptico; GC: grisea central; LC: *locus coeruleus*; SR: rafe. Fonte: Silva et al. (2018).

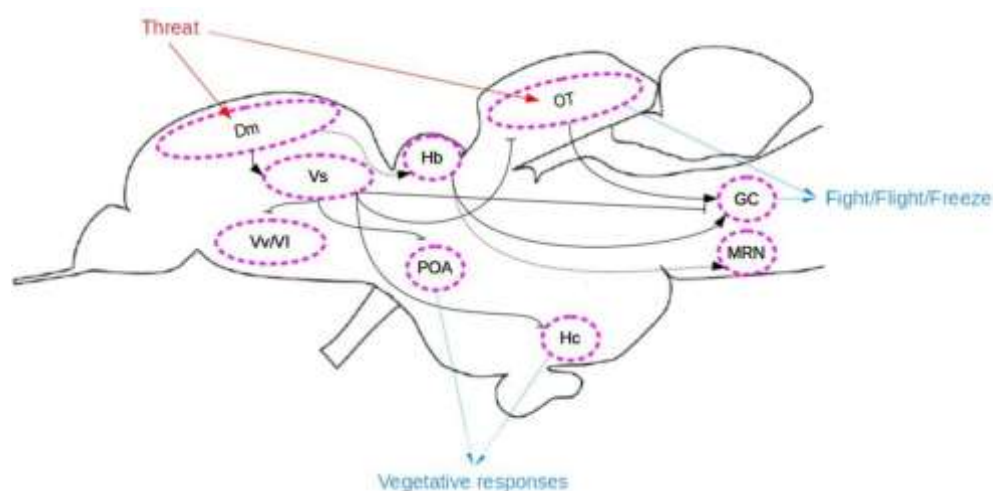
A habenula (Hb) é outra estrutura de interesse para a sinalização nitrgica e para circuitos de defesa, sendo subdivida em ventral e dorsal. A habenula ventral (vHb) parece associada à determinação da intensidade do estímulo aversivo, enquanto a habenula dorsal (dHb) parece relacionada à mudança de estratégia de enfrentamento ativo ao estímulo aversivo para comportamentos associados ao enfrentamento passivo. Há aparente interação e

complementaridade entre essas regiões (Silva, Lima-Maximino, et al., 2018). Além dela, há o teto óptico (OT), que é homólogo ao colículo superior de mamíferos e está associado à detecção de estímulos aversivos visuais (Nieuwenhuys et al., 1998), o núcleo ventral do telencéfalo ventral (Vv), que parece homólogo à área septal (O'Connell & Hofmann, 2011), a grisea central (GC), homóloga à substância cinzenta periaquedutal (PAG) de mamíferos e que, portanto, parece exercer modulação sobre comportamentos sociais de machos e fêmeas, o que inclui reprodução e agressividade (O'Connell & Hofmann, 2011), o hipotálamo caudal (Hc), o *locus coeruleus* (LC) e os núcleos medianos da rafe (MRN) (Silva, Lima-Maximino, et al., 2018), conforme ilustrado na Figura 2.

A Figura 3 ilustra os principais circuitos de defesa em encéfalos de peixes teleósteos. Segundo o esquema, proposto por Silva et al. (2018), circuitos telencefálicos e habenuares participam de forma importante da organização de respostas a uma ameaça; essenciais para respostas adequadas a cada contexto. Quanto aos circuitos hipotalâmicos, participam de respostas neuroendócrinas e neurovegetativas. Somado a isso, projeções para interneurônios no OT mediam respostas rápidas de fuga via projeções para a GC e/ou para os circuitos cerebrais de escape. Estímulos aversivos, especialmente os visuais, podem agir diretamente sobre OT, resultando em respostas de escape (Silva, Lima-Maximino, et al., 2018).

Figura 3

Circuitos de Defesa Relacionados à Detecção, à Identificação, ao Processamento e à Seleção de Respostas a Ameaças em Encéfalo de Peixes Teleósteos



Nota. Circuitos de defesa relacionados à detecção, à identificação, ao processamento e à seleção de respostas a ameaças em encéfalo de peixes teleósteos que podem resultar em *outputs* vegetativos e/ou luta, fuga ou congelamento. Dm: núcleo medial do telencéfalo dorsal; Vs: núcleo supracomissural do telencéfalo ventral; Vv: núcleo ventral do telencéfalo ventral; Vl: núcleo lateral do telencéfalo ventral; Hb: habenula; POA: área pré-óptica; Hc: hipotálamo caudal; OT: teto óptico; GC: grisea central; MRN: núcleos medianos da rafe. Setas pretas contínuas: projeções diretas; setas pretas tracejadas: projeções indiretas; setas terminando em linhas de dimensão ($\perp$): projeções inibitórias; setas azuis: saídas/*output*; setas vermelhas: entradas/*input*. Fonte: Silva et al. (2018).

A demonstração da ativação ou da inibição de uma estrutura encefálica por um estímulo ou paradigma comportamental específico é uma abordagem clássica para a descrição de circuitos relacionados ao comportamento (Silva, Lima-Maximino, et al., 2018). Com base

nisso, a identificação de áreas encefálicas marcadas pela atividade da enzima NADPH-diaforase surge como uma importante ferramenta para a descrição de regiões nas quais tenha ocorrido atividade neural do sistema nitrérgico (Giraldez-Perez et al., 2008).

Estudo de Beijamini e Guimarães (2006a) demonstrou que a exposição de ratos Wistar machos ao modelo de labirinto em cruz elevado (EPM) aumenta a quantidade de neurônios positivos para NADPH-diaforase nos núcleos paraventricular parvocelular (pPVN) e lateral (LH) do hipotálamo, na substância cinzenta periaquedutal dorsolateral (dlPAG) e no núcleo dorsal da rafe (DRN) (Beijamini & Guimarães, 2006a). De forma semelhante, a marcação de neurônios nitrérgicos em áreas associadas a respostas tipo ansiedade foi demonstrada em modelo de abstinência de etanol, no qual ratos Wistar machos apresentaram maior atividade de NADPH-diaforase no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), na dlPAG e no DRN (Bonassoli et al., 2011). Além disso, a exposição desses animais a um gato (estímulo inato de medo) demonstrou aumento da marcação histoquímica de c-Fos e NADPH-diaforase no BNST, na amígdala medial (MeA), no pPVN, no LH, no núcleo hipotalâmico pré-mamilar dorsal (PMd), na dlPAG e no DRN, o que sugere uma relação entre a exposição a um predador e a ativação de neurônios nitrérgicos em áreas associadas a reações de defesa (Beijamini & Guimarães, 2006b).

A NADPH-diaforase é definida como um marcador histoquímico da NOS em tecidos tratados com aldeído, pois a atividade catalítica da NOS parece promover a redução dependente de NADPH do nitro-azul tetrazólio (NBT) para o diformazan (Hope et al., 1991). No entanto, Seckler et al. (2020) sugerem que a marcação de NADPH-diaforase observada em tecidos fixados em aldeído não é enzimática, mas sim decorrente de fatores contendo NO, como S-nitrosotióis livres ou proteínas nitrosiladas, que promovem a redução dependente de NADPH do NBT para o diformazan (Seckler et al., 2020). De qualquer forma, a utilização da

reação é um marcador importante para identificar regiões encefálicas de atividade do sistema nitrérgico, o que a torna de grande relevância para a análise histoquímica de encéfalos de *zebrafish* no contexto de exposição à CAS.

Outros componentes de respostas tipo ansiedade possíveis estão no nível de observação bioquímico, são as concentrações teciduais de analitos de interesse. Entre estes, estão os níveis teciduais de nitrito e/ou nitrato (NO_x^-), que são metabólitos da degradação de NO e indicam se houve aumento da atividade do sistema nitrérgico frente a alguma intervenção experimental (Vila-Verde et al., 2016). Além dos níveis de NO_x^- , os níveis teciduais de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), marcadores de estresse oxidativo, também configuram importante variável (Sachett, Gallas-Lopes, Conterato, et al., 2020). Estes últimos podem ser determinados por meio do ensaio de peroxidação lipídica, um processo de oxidação de lipídios das membranas celulares por ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que cursa com produção de malondialdeído (MDA) (Gutteridge, 1995).

As EROs participam de vias de sinalização bioquímicas regulando a proliferação celular, a apoptose, a resposta inflamatória e a adaptação ao estresse (Şahin & Gümüşlü, 2004). Apesar disso, o aumento de EROs pode suplantiar a capacidade dos mecanismos celulares antioxidantes, resultando em danos estruturais em proteínas, lipídios e DNA, o que contribui para o desenvolvimento de disfunções em diversos tecidos do organismo, inclusive o tecido nervoso (Gutteridge, 1995). Frente aos efeitos deletérios do estresse oxidativo, o organismo dispõe de mecanismos antioxidantes enzimáticos (Cu/Zn-superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase selênio-dependente) e não enzimáticos (glutathione reduzida) (Gutteridge, 1995).

A exposição a um estressor, seja ele físico, psicológico ou social, resulta em produção de EROs, a exemplo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), do radical hidroxila ($\text{HO}^\cdot$) e do radical

ânion superóxido (O_2^-) (Şahin & Gümüşlü, 2004). Dal Santo et al. (2014) observaram que o estresse agudo de contenção está associado a alterações em mecanismos de estresse oxidativo em *zebrafish* ao enfatizar a diminuição da atividade da catalase e o aumento nos níveis de peróxidos lipídicos, resultados que amparam o uso de marcadores do estresse oxidativo para o estudo de mecanismos subjacentes às respostas de estresse no cérebro de *zebrafish* (Dal Santo et al., 2014).

O estudo de Carvalho et al. (2019) demonstrou que o tratamento com alfa-tocoferol, um agente antioxidante, reverte os efeitos da cafeína sobre o aumento do comportamento tipo ansiedade em teste de DVEN e dos níveis de MDA no cérebro de *zebrafish* (de Carvalho et al., 2019). Em estudo de Mocelin et al. (2019), o tratamento com N-acetilcisteína (NAC), uma droga precursora do peptídeo antioxidante glutathione, demonstrou reverter o aumento de comportamentos tipo ansiedade e do dano oxidativo associado ao estresse crônico imprevisível em *zebrafish*. Entre as variáveis bioquímicas analisadas, observou-se aumento dos níveis de ROS e de peroxidação lipídica, e diminuição dos níveis de tióis não proteicos e da atividade da superóxido dismutase (Mocelin et al., 2019). Esses achados sugerem uma relação causal entre a exposição a um evento estressor e o aumento do estresse oxidativo no cérebro, o que reforça a relevância da utilização da concentração de TBARs como variável para o entendimento de aspectos fisiológicos relacionados a respostas de ansiedade.

1.2. REDES DE ATIVAÇÃO NEURONAL

O desenvolvimento de modelos computacionais para o estudo de circuitos neurais permitiu o estabelecimento das redes neurais em grande escala (*large-scale brain networks*), conjuntos de áreas que demonstram conectividade funcional por meio de análise estatística e a partir de dados de imagem ou de outros sinais cerebrais rede (Bressler & Menon, 2010).

Métodos como a ressonância magnética funcional (fMRI), o eletroencefalograma (EEG) e a magnetoencefalografia (MEG), por exemplo, fornecem dados que possibilitam estabelecer relações entre pontos, característica da análise de rede (Bressler & Menon, 2010). Considerando isso, entende-se o funcionamento do sistema nervoso como redes interconectadas que apresentam, principalmente, uma conectividade funcional; as diferentes áreas funcionam em conjunto, conexão essa que não precisa ser, necessariamente, direta (Bressler & Menon, 2010). A ideia das redes se opõe ao tradicional paradigma de localização funcional, pois enfatiza as relações funcionais existentes entre as diferentes áreas encefálicas durante a execução de um comportamento (Bressler & Menon, 2010).

As redes podem ser geradas por meio de algoritmos como a análise de *clusters*, a análise de componentes espaciais independentes (*spatial independent component analysis*; ICA), a análise *seed based*, etc, bem como por sincronização de longo alcance do EEG, MEG ou outros sinais dinâmicos cerebrais (Bressler & Menon, 2010; Petersen & Sporns, 2015). No geral, não há um atlas universal que delimite todas as propriedades neurobiológicas e circunstâncias nas quais as redes neurais em grande escala estejam implicadas (Bressler & Menon, 2010), principalmente pelo reconhecimento de que o comportamento decorre da interação contínua com um ambiente em constante mudança e repleto de possibilidades (Cisek & Kalaska, 2010). Apesar disso, Uddin et al. (2019) propuseram 6 redes neurais, considerando convergências entre evidências oriundas de diversos estudos, para facilitar a comunicação entre pesquisadores interessados no estudo dos fenômenos comportamentais a partir dos circuitos que os compõem, são elas a rede de modo padrão (*default mode network*), a rede de saliência (*salience network*), a rede de atenção (*attention network*), a rede executiva central (*central executive network*), a rede somato-motora (*somatomotor network*) e a rede visual (*visual network*) (Uddin et al., 2019).

Para o estudo da conectividade funcional relacionada a sistemas comportamentais de defesa, duas redes neurais em larga escala parecem ser relevantes, a rede de modo padrão, que está ativa quando o indivíduo se encontra acordado e em repouso, sendo geralmente associada a tarefas privadas, e a rede de saliência, que parece relacionada à identificação de estímulos relevantes, compreendendo, principalmente, estruturas como a ínsula anterior, o córtex cingulado anterior, o estriado ventral e a área tegmental ventral (Uddin et al., 2019). Essas redes podem refletir, em partes, a atividade funcional de circuitos cerebrais enquanto o organismo está submetido a condições controle (rede de modo padrão) ou a situações aversivas (rede de saliência) (Uddin et al., 2019). Logo, constituem abordagens interessantes para a interpretação de dados que avaliem animais expostos à CAS.

Em camundongos (*Mus musculus*), três redes funcionais foram descritas, com base em padrões de conectividade funcional, hodologia, e ativação após estimulação da ínsula (Mandino et al., 2022). Essas redes foram nomeadas por analogia às redes descritas em humanos; dessa maneira, esses animais parecem apresentar uma rede de modo padrão, uma rede de saliência, e uma rede cortical lateral (Mandino et al., 2022). Em zebrafish, a utilização de ferramentas de imageamento de cálcio e co-expressão de genes em encéfalos de larvas descreveu 7 módulos funcionais que se relacionam com diferentes funções visuo-motoras (Légaré et al., 2025). Esses módulos podem estar relacionados à flexibilidade comportamental em resposta a estímulos ecologicamente relevantes, como alimento e predadores (Mu et al., 2020). Recentemente, uma aproximação semelhante foi utilizada para identificar regiões que respondem à CAS em larvas, com co-ativação de regiões como bulbo olfatório, epitélio olfatório, zona posterior do telencéfalo dorsal (Dp), zona intermediária do telencéfalo ventral (Vi), e habenula (Jesuthasan et al., 2021).

Com base nisso, a utilização de dados obtidos a partir da marcação por NADPH-diaforase passa a ser uma forma de avaliar a conectividade funcional entre áreas de relevância para respostas de defesa após exposição à CAS. Enfatiza-se como ganho metodológico não apenas a descrição da ativação de áreas em um dado contexto experimental, mas a possibilidade de propor uma relação funcional entre essas áreas, haja vista que tarefas cognitivas são realizadas enquanto várias áreas cerebrais funcionam em conjunto (Bressler & Menon, 2010).

1.3. HIPÓTESES E PREVISÕES

O presente projeto se propôs a estudar qual o papel exercido pelo sistema nitrérgico em respostas tipo ansiedade, considerando aspectos comportamentais, bioquímicos e histoquímicos. Isto é, buscamos investigar se a diminuição da disponibilidade de NO a partir da NOS-1 altera variáveis comportamentais e bioquímicas frente ao estresse agudo por CAS e se a exposição à CAS é capaz de alterar os padrões de conectividade funcional entre regiões com atividade nitrérgica no encéfalo de *zebrafish*.

Para isso, como estratégia investigativa, avaliamos comportamentos tipo ansiedade e níveis bioquímicos de nitrito e TBARS frente à exposição ao estresse agudo por CAS, e por meio da modulação pela droga inibidora de NOS-1 em modelo animal. Além disso, foi realizada avaliação das áreas encefálicas de atividade nitrérgica frente à exposição à CAS, bem como a análise de rede para estabelecer uma relação de conectividade funcional entre elas. Nesse sentido, como hipóteses, propusemos que:

- (1) A isoforma NOS-1 viabiliza a produção de NO responsável por aumentar respostas tipo ansiedade frente ao estresse agudo por CAS, o que inclui diferentes ajustes comportamentais em *zebrafish*;
- (2) A exposição à CAS leva a estresse oxidativo e nitrosativo no encéfalo de *zebrafish*;
- (3) A exposição à CAS leva a uma maior atividade nitrérgica em regiões encefálicas relacionadas a circuitos de defesa em *zebrafish*;
- (4) Os padrões de correlação entre a atividade nitrérgica de áreas encefálicas se alteram frente à exposição à CAS em *zebrafish*.

1.4. JUSTIFICATIVA

De forma geral, a neurofisiologia de respostas de ansiedade configura um importante fenômeno a ser estudado, seja por suas implicações sobre processos de resiliência ao trauma, pela busca de novos alvos farmacológicos ou pela necessidade, a nível de ciência básica, de entender quais os mecanismos proximais subjacentes. Assim, fazem-se necessárias pesquisas capazes de propor e investigar hipóteses relacionadas a aspectos celulares e/ou moleculares envolvidos. Ao considerar a influência da neurotransmissão nitrérgica sobre respostas de ansiedade, torna-se imprescindível a investigação do papel da disponibilidade de NO, assim como a influência da exposição aguda à CAS, nessas repostas. Para isso, e devido às limitações da pesquisa com humanos, o *zebrafish* se mostra uma ótima alternativa, pois apresenta boa relação custo-benefício, suficiente homologia quanto ao sistema nitrérgico, modulação do estresse via cortisol, maior pico de atividade durante o dia, comportamentos defensivos bem descritos, modelagem para estresse agudo com base na utilização de CAS e padrões importantes de validade para estudos em psiquiatria biológica.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a participação do sistema nitrérgico em respostas tipo-ansiedade decorrentes de estresse agudo por substância de alarme co-específica em *zebrafish* (*Danio rerio*, Hamilton, 1822).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

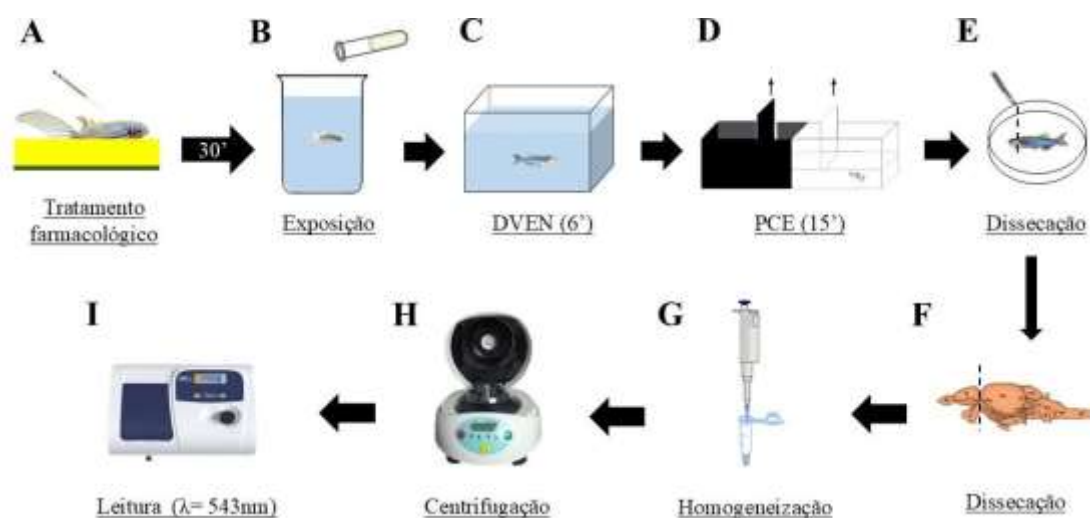
- Replicar o modelo de estresse agudo por substância de alarme co-específica de forma a observar os comportamentos característicos de respostas tipo ansiedade frente aos testes de distribuição vertical eliciada pela novidade e de preferência claro-escuro;
- Avaliar a participação da enzima óxido nítrico sintase 1 em respostas comportamentais tipo ansiedade observadas no modelo a ser replicado a partir da inibição por 7-NI;
- Quantificar as concentrações de nitrito presentes nos tecidos de telencéfalo dos animais expostos às diferentes condições experimentais por espectrofotometria;
- Determinar os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico presentes nos tecidos de telencéfalo dos animais expostos às diferentes condições experimentais por espectrofotometria;
- Determinar as áreas encefálicas dos circuitos de defesa com maior ativação nitrérgica após exposição ao estresse por substância de alarme co-específica a partir dos valores de densidade óptica obtidos da marcação por NADPH-diaforase;

- Analisar a conectividade funcional das áreas encefálicas marcadas por NADPH-diaforase em animais expostos ao controle ou à substância de alarme co-específica.

3. MÉTODOS

3.1. DELINEAMENTO DA PESQUISA

O presente trabalho apresenta achados comportamentais, bioquímicos e histoquímicos para responder ao objetivo geral de investigar a participação do sistema nitrérgico em respostas tipo ansiedade induzidas por exposição aguda à CAS (Egan et al., 2009). A Figura 4 ilustra o delineamento experimental utilizado para a obtenção dos dados comportamentais e bioquímicos. Diferentes grupos de animais foram previamente tratados com 10 ou 30 mg/kg de 7-NI, droga inibidora da produção do óxido nítrico pela NOS-1, ou com o veículo diluente da droga (DMSO 5%) (de Sousa et al., 2024). Após 30 minutos do tratamento, os animais foram individualmente expostos à CAS ou à água destilada (Egan et al., 2009) e, em seguida, submetidos ao teste de DVEN (Cachat et al., 2010). Logo após, cada animal foi submetido ao teste de PCE (Maximino et al., 2010) e, em seguida, à dissecação para a obtenção do tecido telencefálico destinado à quantificação bioquímica de metabólitos do NO e de TBARs, etapa realizada por espectrofotometria.

Figura 4*Delineamento Experimental: Comportamento e Bioquímica*

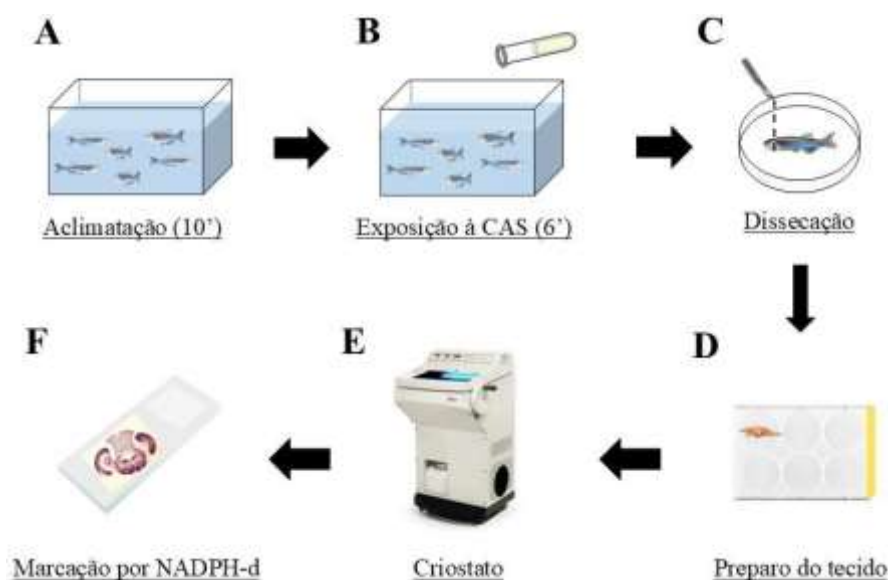
Nota. Etapas experimentais para a obtenção dos dados comportamentais e bioquímicos. (A) Tratamento farmacológico realizado 30 minutos antes da exposição; (B) Exposição à CAS ou à água destilada; (C) Teste de DVEN; (D) Teste de PCE; (E) Eutanásia para dissecção do encéfalo; (F) Secção do telencéfalo no nível da habenula; (G) Homogeneização do tecido coletado; (H) Centrifugação para a retirada do sobrenadante a ser utilizado nos ensaios bioquímicos; (I) Leitura das reações bioquímicas de cada amostra por espectrofotometria.

Fonte: Arquivo pessoal (2024).

Na Figura 5, observa-se a ilustração do delineamento experimental utilizado para a obtenção dos dados histoquímicos. Para essa etapa experimental, grupos de 6 animais foram expostos à CAS ou à água destilada durante 6 minutos, após um período de aclimação de 10 minutos. Em seguida, cada um foi individualmente submetido à dissecção do encéfalo, seguida de preparo do tecido, corte em criostato e, por fim, marcação da lâmina com a adaptação da técnica histoquímica de NADPH-diaforase (Giraldez-Perez et al., 2008).

Figura 5

Delineamento Experimental: Histoquímica



Nota. Etapas experimentais para a obtenção dos dados histoquímicos. (A) Aclimação do grupo de 6 animais durante 10 minutos; (B) Exposição à substância de alarme co-específica; (C) Eutanásia e dissecção; (D) Preparo do tecido em várias etapas; (E) Realização dos cortes histológicos em criostato; (F) Marcação histoquímica por NADPH-diaforase. Fonte: Arquivo pessoal (2024).

3.2. ANIMAIS E ALOJAMENTO

Para a realização dos experimentos, foram utilizados 135 peixes paulistinhas (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) adultos da linhagem *longfin* (Figura 6), adquiridos de um fornecedor local e oriundos de cruzamentos heterogêneos. Animais do fenótipo *longfin* apresentam maior sensibilização da resposta tipo ansiedade (Lima et al., 2016), enquanto os cruzamentos

heterogêneos garantem o aumento da variabilidade, o que diminui os efeitos da deriva genética aleatória (Speedie & Gerlai, 2008).

Os grupos experimentais foram determinados por amostragem randômica, sendo os animais selecionados pelo método *fishbowl draw*; captura aleatória até que se alcance a quantidade ideal para compor o grupo de interesse (Kumar, 2011). Para os experimentos comportamentais e bioquímicos, foram utilizados 6 grupos experimentais compostos por 12 animais cada, padrão usual médio por grupo (de Sousa et al., 2024; Herculano et al., 2015). Além desses, 36 animais foram utilizados como doadores de CAS (Quadros et al., 2016). Para a histoquímica, foram utilizados 27 animais no total, sendo 6 animais pertencentes ao grupo controle (exposto à água destilada), 18 animais pertencentes ao grupo tratado (exposto à CAS) e 3 animais utilizados como doadores de CAS para a exposição em grupo.

Os animais foram mantidos em aquários de 50 litros, sob densidade máxima de 5 peixes para cada 1 litro, temperatura de 28 ± 2 °C, pH 7,0-8,0, controle de oxigenação e filtragem da água. Quanto à iluminação, foi oriunda de lâmpadas fluorescentes em um ciclo de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (Lawrence, 2007; Pavlidis et al., 2013).

Os experimentos foram executados nos laboratórios de Neurofarmacologia e Biofísica (LaNeF) da Universidade do Estado do Pará (UEPA), campus VIII, Marabá/PA, de Neurociências e Comportamento (LaNeC) da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (UNIFESSPA), campus III, Marabá/PA, e de Neuroengenharia da Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém/PA. Os animais passaram por um período mínimo de 2 semanas de aclimação nos alojamentos de 50 litros antes que qualquer etapa dos experimentos tenha sido realizada (CCAC, 2005).

Figura 6

Zebrafish do Fenótipo longfin



Nota. Animal do fenótipo *longfin*, caracterizado por nadadeiras longas. Fonte: Adaptado de Kalueff et al. (2014).

3.3. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os animais foram alojados com base nas recomendações do *Canadian Council on Animal Care* (2005) e nas instruções mínimas de Lawrence (2007) para a criação do *zebrafish*. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, sob nº de protocolo 23479.009945/2025-32.

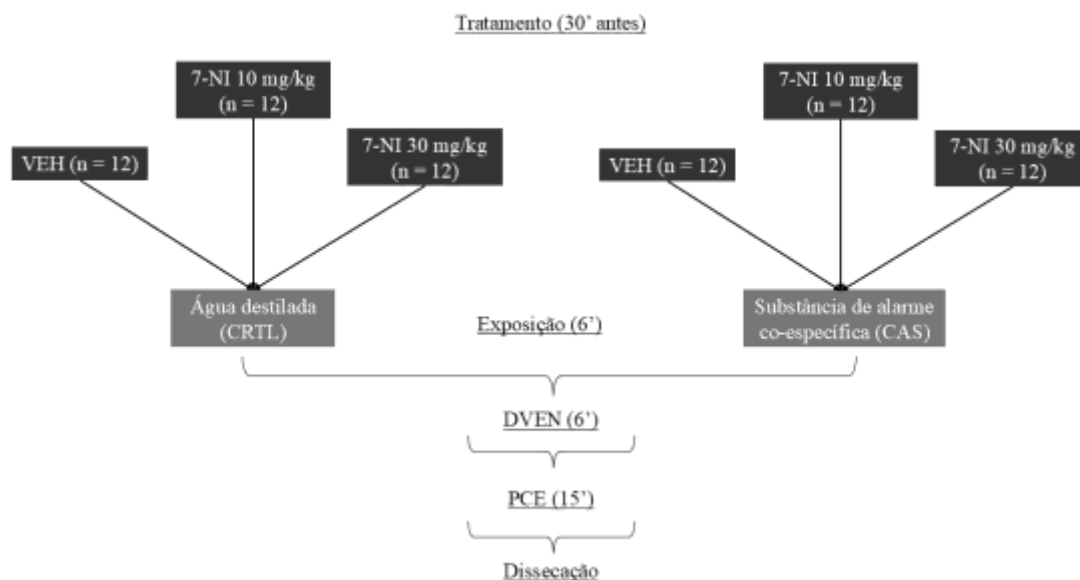
3.4. TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

A participação do sistema nitrérgico foi avaliada a partir da administração do inibidor 7-nitroindazol (7-NI) (7-Nitro-1H-indazol: CAS# 2942-42-9, Sigma-Aldrich N7778) para o bloqueio da enzima NOS-1. Aos animais controle, foi aplicado DMSO a 5%, veículo diluente do 7-NI. As administrações, tanto da droga nas diferentes doses quanto do veículo, ocorreram via intraperitoneal, seguindo protocolo publicado na plataforma JoVE (Kinkel et al., 2010). A

droga foi dissolvida e diluída conforme de Sousa et al. (2024). As preparações objetivaram alcançar doses de 10 (Joung et al., 2012) e 30 mg/kg (MacKenzie et al., 1994), definidas com base na segurança e na capacidade atestada em originar respostas comportamentais pelos referidos estudos.

A Figura 7 esquematiza os grupos experimentais utilizados no estudo. Cada grupo foi composto por 12 animais e classificado de acordo com o tratamento farmacológico e a exposição aos quais tenha sido submetido. Para todos os grupos, a administração da droga correspondente ocorreu 30 minutos antes da exposição ao estresse (CAS) ou à água destilada (controle, CTRL). Após a exposição, cada animal foi submetido ao teste de DVEN, seguido do teste de PCE e, por fim, da dissecação para a obtenção do tecido de interesse. Com base nisso, as combinações de grupos experimentais foram:

- VEH + CTRL: animais tratados com veículo e expostos à água destilada;
- 7-NI_10 + CTRL: animais tratados com 10 mg/kg de 7-NI e expostos à água destilada;
- 7-NI_30 + CTRL: animais tratados com 30 mg/kg de 7-NI e expostos à água destilada;
- VEH + CAS: animais tratados com veículo e expostos à CAS;
- 7-NI_10 + CAS: animais tratados com 10 mg/kg de 7-NI e expostos à CAS;
- 7-NI_30 + CAS: animais tratados com 30 mg/kg de 7-NI e expostos à CAS.

Figura 7*Delineamento dos Grupos Experimentais e Etapas*

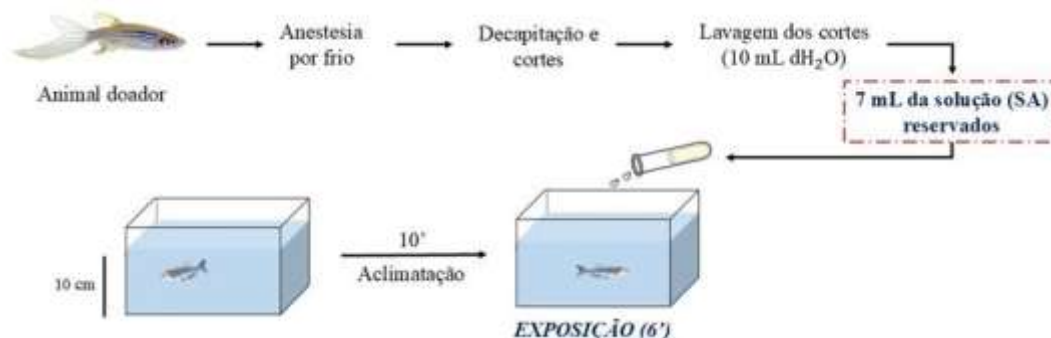
Nota. Grupos e etapas experimentais. VEH: veículo; 7-NI: 7- nitroindazol; DVEN: teste de distribuição vertical eliciada pela novidade; PCE: teste de preferência claro-escuro. Fonte: Arquivo pessoal (2025).

3.5. EXTRAÇÃO E EXPOSIÇÃO À SUBSTÂNCIA DE ALARME

A CAS foi a ferramenta experimental utilizada para eliciar respostas tipo ansiedade nos animais (Egan et al., 2009; Lima et al., 2016). Para sua obtenção, foi utilizado o protocolo publicado na plataforma “[protocols.io](https://www.protocols.io)” (Silva, Rocha, et al., 2018) (disponível em: [dx.doi.org/10.17504/protocols.io.tr3em8n](https://doi.org/10.17504/protocols.io.tr3em8n)), assim como as descrições de Egan et al. (2009) e Maximino et al. (2014). Nesse sentido, como ilustrado pela Figura 8, um animal doador do mesmo fenótipo foi anestesiado por frio e, em seguida, decapitado (o excesso de sangue decorrente dessa etapa foi retirado com o auxílio de um cotonete). A partir de então, foram

realizados 15 cortes superficiais na epiderme do animal (região medial-ventral), com o objetivo de provocar lesões nas células produtoras de CAS, mas sem resultar em lesão de camadas mais profundas do tecido. Ao final, a região dos cortes foi lavada com 10 mL de água destilada, formando uma solução a partir da qual 7 mL livres de quaisquer outros resquícios de restos animais (escamas, sangue, entre outros) foram reservados para serem utilizados durante a exposição. Com base no protocolo, espera-se que a água utilizada para lavar os cortes contenha as moléculas de CAS.

Para a exposição dos animais ao estímulo aversivo, foi utilizado um aquário de vidro contendo 2L de água e coluna d'água de 10 cm de altura. Duas formas de exposição à CAS foram aplicadas nesta pesquisa: a exposição individual para os animais submetidos à intervenção farmacológica e a exposição em grupo para os animais destinados à análise histoquímica. No primeiro caso, cada animal foi individualmente submetido a um período de aclimação de 10 minutos, seguido da exposição aos 7 mL da CAS durante 6 minutos (Egan et al., 2009; Figura 8). No segundo caso, ilustrado na Figura 5, grupos de 6 animais foram submetidos ao período de aclimação de 10 minutos e, em seguida, expostos ao estímulo aversivo durante os 6 minutos. Os grupos de animais não expostos à CAS foram expostos à água destilada (controle).

Figura 8*Obtenção da CAS e Exposição dos Animais*

Nota. Etapas para a obtenção da substância de alarme co-específica e para a exposição individual dos animais. Fonte: Arquivo pessoal (2024).

3.6. DISTRIBUIÇÃO VERTICAL ELICIADA PELA NOVIDADE

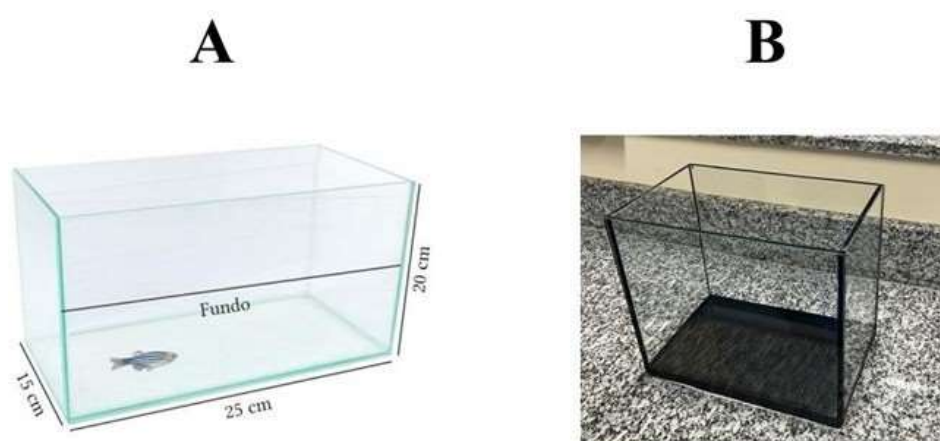
Para o teste comportamental de DVEN, cada animal foi individualmente transferido para um aparato de dimensões de 15 cm x 25 cm x 20 cm (largura x comprimento x altura) e coluna d'água de 15 cm, momento a partir do qual estiveram livres para explorar o ambiente durante 6 minutos. O tempo de teste foi filmado com o auxílio de um dispositivo adequado para capturar vídeo de alta qualidade. A Figura 9 apresenta o aparato destinado ao teste.

O aparato foi iluminado por uma média de 563 lux (449-599) sobre o DVEN e de 537 lux (416-580) sobre o PCE (Lima, 2015), fornecidos por lâmpadas fluorescentes e mensurados por meio de um luxímetro *Instrutherm* LD 300. Além disso, todo o experimento foi executado sob ruído branco Gaussiano, com média de 66 dB acima de ambos os aparatos

(variações de 64-69 para o DVEN e de 64-70 para o PCE), sendo a mensuração dada pelo aplicativo Decibelímetro, versão 1.2.4 para sistema Android.

Figura 9

Aparato para o Teste de DVEN



Nota. Aparato para o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade. (A) Ilustração com as dimensões exatas do aparato; (B) Imagem real do aparato. Fonte: (A) (Santos, 2023); (B) Arquivo pessoal (2024).

Uma câmera foi posicionada à frente do aquário de forma a possibilitar a avaliação da distribuição lateral e vertical do animal. Os arquivos de vídeo obtidos foram analisados com o auxílio do programa *TheRealFishTracker* (disponível em: <https://www.dgp.toronto.edu/~mccrae/projects/FishTracker/>), a partir do qual foram registradas as seguintes variáveis, de acordo com o *Zebrafish Behavioral Catalog* (códigos em parêntesis) de Kalueff et al. (2013), por um observador cego às condições experimentais:

- *Tempo no fundo (Geotaxia)* (ZBC 1.46): tempo gasto, em segundos, pelo animal no terço inferior do aquário teste;

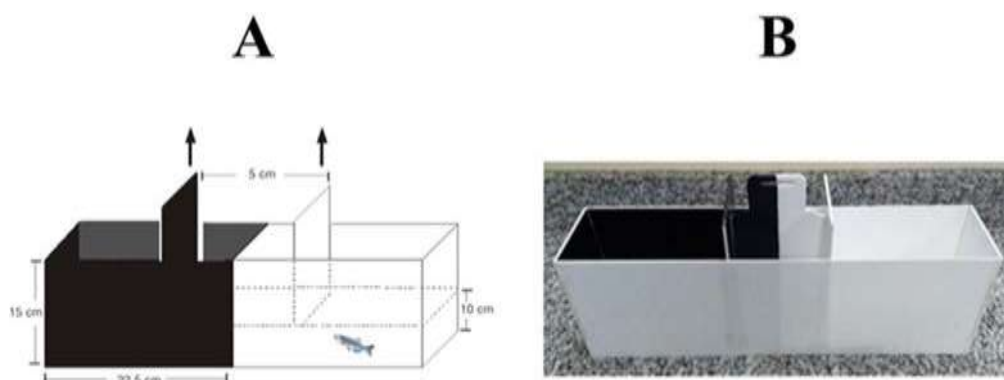
- *Tempo no topo*: tempo gasto, em segundos, pelo animal no terço superior do aquário teste;
- *Nado errático (Ângulo absoluto)* (ZBC 1.51): a média de ângulo absoluto de virada realizadas pelo animal;
- *Congelamento* (ZBC 1.68): a quantidade de tempo no qual o animal apresentou velocidade de nado menor do que 0,5 cm/s;
- *Velocidade*: velocidade média de nado de cada animal durante o teste em cm/s.

3.7. PREFERÊNCIA CLARO-ESCURO

O aparato para o teste de PCE, apresentado na Figura 10, possui dimensões 15 cm x 10 cm x 45 cm e é metade branco e metade preto. Para a realização do teste, cada animal é individualmente mantido no compartimento central do aparato para que passe por 3 minutos de habituação, momento a partir do qual são retiradas as portinholas que isolam o compartimento central e, então, o animal pode explorar livremente o ambiente por 15 minutos. Os minutos de teste foram gravados por um dispositivo adequado para capturar vídeo de alta qualidade. Os parâmetros de iluminação e ruído seguiram as descrições propostas para o teste de DVEN (Maximino et al., 2010).

Figura 10

Aparato para o Teste de PCE



Nota. Aparato para o teste de preferência claro-escuro. (A) Ilustração das dimensões exatas do aparato; (B) Imagem real do aparato. Fonte: (A) Adaptado de Maximino et al. (2010); (B) Arquivo pessoal (2024).

Os registros visuais também foram analisados com o auxílio do programa *The Real Fish Tracker*, sendo as variáveis comportamentais computadas quando apresentadas pelos animais no lado branco do aquário, como previsto por Maximino et al. (2010). De acordo com o *Zebrafish Behavioral Catalog* (códigos em parêntesis) (Kalueff et al., 2013), foram computadas, por um observador cego às condições experimentais, as seguintes variáveis:

- *Tempo no branco*: tempo gasto, em segundos, na parte clara do aparato, relacionado à preferência natural do animal por ambientes escuros (escototaxia);
- *Nado errático (Ângulo absoluto)* (ZBC 1.51): a média de ângulo absoluto de virada realizadas pelo animal;
- *Congelamento* (ZBC 1.68): a quantidade de tempo no qual o animal apresentou velocidade de nado menor do que 0,5 cm/s;

- *Velocidade*: velocidade média de nado de cada animal durante o teste em cm/s.

3.8.OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DO TECIDO PARA A ANÁLISE BIOQUÍMICA

Para a obtenção das amostras de tecido destinadas à análise bioquímica, os animais foram eutanasiados em gelo e transferidos a uma placa de Petri para que fosse feita a dissecação do telencéfalo, de acordo com o protocolo publicado na plataforma “[protocols.io](https://www.protocols.io)” (Sachett, Gallas-Lopes, Radharani, et al., 2020) (disponível em: dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjkdkks6). Em seguida, foi realizada a decapitação e a remoção da pele e de estruturas cranianas, a fim de expor o tecido nervoso de interesse. Seguindo Lima (2015), foram utilizadas uma tesoura oftalmológica e pinças de microdissecação para garantir que o telencéfalo fosse separado, na altura da habenula, das demais estruturas encefálicas que não entraram na análise.

Para a preparação da amostra, foram realizadas adaptações dos protocolos publicados em “protocols.io” por (Maximino, Oliveira, et al., 2018) e Sachett et al. (2020) (disponíveis em: dx.doi.org/10.17504/protocols.io.sabeaan e dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjkdkks6, respectivamente). Foi feita a homogeneização mecânica em 400 µL de PBS (NaCl 0,8%, KCl 0,02%, K₂HPO₄ 0,02 M, pH 7,3), seguida de centrifugação para a obtenção do sobrenadante a ser utilizado nas reações bioquímicas de interesse.

3.9. QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO E PROTEÍNAS

Os níveis teciduais de nitrito (NO₂⁻) foram determinados com base na reação de Griess (Griess, 1864). Por ser um metabólito do NO, é uma forma indireta de atestar se houve ou não

atividade nitrérgica frente às intervenções experimentais. Quanto ao ensaio utilizado, baseia-se em uma diazotização de dois passos; envolve uma reação inicial entre o nitrito contido na amostra e o ácido sulfanílico para formar o íon diazônio sob condições ácidas. A reação seguinte acontece em decorrência do acoplamento do íon anteriormente formado à N-(1-naftil) etilenodiamina, resultando em um azo-derivado cromóforo capaz de absorver luz em comprimento de onda de 540 nm por espectrofotometria (Hetrick & Schoenfisch, 2009).

Para os ensaios, volumes iguais de amostra e reagente de Griess (composto por ácido fosfórico 5%, N-(1-naftil)-etilenoamina 0,1% e sulfanilamida 1%) foram misturados e incubados por 10 minutos ao abrigo de luz e em temperatura ambiente. Além disso, as concentrações em cada amostra foram determinadas a partir da utilização da curva-padrão de nitrito de sódio.

Para a padronização da análise bioquímica, as concentrações de NO_2^- obtidas foram normalizadas pela quantidade de proteínas totais nas amostras, etapa metodológica denominada de linearização do ensaio de Bradford (Zor & Selinger, 1996). Em condições ácidas, o corante Azul Brilhante de Coomassie G-250 doa elétrons livres aos grupos ionizáveis das proteínas, o que expõe os bolsões hidrofóbicos proteicos a serem ligados às regiões não-polares do corante durante a reação. Como resultado, obtém-se uma solução em coloração azul a ser mensurada por espectrofotometria em comprimento de onda de 595 nm. As dosagens de proteínas foram baseadas em adaptações do protocolo publicado em “protocols.io” (Sachett et al., 2020) (disponível em: [dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjnfkmbn](https://doi.org/10.17504/protocols.io.bjnfkmbn)).

3.10. QUANTIFICAÇÃO DE TBARs

O ensaio para a quantificação de TBARs envolve a reação de produtos da peroxidação lipídica, especialmente o MDA, com o ácido tiobarbitúrico (TBA). A reação é responsável por

formar adutos de cor vermelho-rosada denominados TBARs que podem ser medidos por espectrofotometria em condições ácidas, após banho-maria a 95°C e em comprimento de onda de 532 nm (de Leon & Borges, 2020).

A análise dos níveis de TBARs foi realizada nas amostras de telencéfalo com base em adaptações do protocolo de Sachett et al. (2020), publicado na plataforma “[protocols.io](https://www.protocols.io)” (disponível em: [dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjp8kmrw](https://doi.org/10.17504/protocols.io.bjp8kmrw)). As concentrações encontradas foram ajustadas de acordo com os níveis de proteínas totais medidas em cada amostra (Zor & Selinger, 1996).

3.11. PREPARAÇÃO DO TECIDO E MARCAÇÃO DA ATIVIDADE NEURAL POR MEIO DE NADPH-DIAFORASE

A marcação histoquímica da atividade do sistema nitrérgico frente ao modelo de exposição à CAS foi realizada com base em adaptações do protocolo de Giraldez-Perez et al. (2008), implementado para o peixe *goldfish* (*Carassius auratus*). Para esse experimento, após a dissecação, os encéfalos foram mantidos em microplacas de seis poços contendo paraformaldeído a 4% em pH 7.2 (PFA 4%) durante 24 horas, sob temperatura de 4°C; etapa destinada a garantir a integridade do tecido. Após isso, foram realizadas quatro lavagens em tampão fosfato de sódio a 0.1M (PBS) e uma lavagem em tampão Tris-HCL a 0.1M. Em seguida, as amostras foram submetidas à crioproteção em sacarose a 30% durante a noite (cerca de 12 horas). No dia seguinte, cada encéfalo foi imerso no meio *Optimal Cutting Temperature* (OCT), destinado a proteger os neurônios de danificação durante o congelamento, e submetido aos cortes histológicos em um criostato de modelo Leica CM-1850 UV, sob temperatura de -20°C e com espessura de corte 25µm, 30µm e 50µm.

Após a realização dos cortes, os tecidos foram novamente lavados com tampão Tris-HCL a 0.1M a fim de eliminar os resquícios de meio OCT. Em seguida, foi iniciada a reação de NADPH-diaforase, processo que se deu em três etapas. Na primeira etapa, os cortes de tecido foram adicionados em 1 mL da solução Tris-T (3µl do detergente Triton-X a 0,05% + 0,997 µl de Tris-HCL a 0,1M) por um período de 2 horas e, em seguida, lavados com tampão Tris-HCL por cinco minutos. O detergente Triton-X é utilizado para deixar as células suscetíveis à marcação, enquanto a lavagem é realizada para evitar o desgaste do tecido por tal detergente. Na segunda etapa, também denominada de pré-incubação, são adicionados 970µl de Tris NBT (tampão Tris-HCL + NBT) aos cortes por um período de uma hora, sob temperatura ambiente e a uma rotação orbital de 100 rpm.

Na terceira etapa, denominada de incubação, adiciona-se aos cortes o reagente Tris-β-NADPH a 1mM, sob agitação e durante cerca de 20 minutos, período a partir do qual a reação deve ser periodicamente inspecionada para identificar a marcação púrpura característica. Quando a marcação é observada, interrompe-se a reação por meio de lavagem com Tris-HCL a 0,1M. Após as etapas de marcação, os cortes são retirados das placas e posicionados em lâminas histológicas gelatinizadas para secar por cerca de 12 horas. Após esse período, os cortes são desidratados em soluções com concentrações crescentes de álcool etílico: 30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%; e posteriormente cobertos com 20µl de meio de montagem (Permount®) e lamínulas.

Com os cortes histológicos prontos, as lâminas foram observadas em microscópio óptico binocular Zeiss e fotografadas em qualidade de 62MP por um aparelho celular Samsung A52. As imagens foram analisadas com o auxílio do *software* ImageJ a fim de determinar os valores de densidade óptica para as regiões encefálicas Dm, Dl, Vs, POA, Vp, OT, vHb, dHb, Hc, LC, GC e SR.

3.12. ANÁLISE DE DADOS

Os dados comportamentais, bioquímicos e histoquímicos foram analisados por meio do *software* JASP 0.95.1.0. Para as variáveis comportamentais e bioquímicas (níveis de NO_x^- e TBARs em telencéfalo), foram aplicados análise de variância (ANOVA) de duas vias e pós-teste de Tukey. Quanto à variável densidade óptica, obtida a partir da histoquímica, foram realizadas comparações entre os valores de cada região encefálica investigada nos grupos expostos à CAS e ao controle por meio do Teste t de *Student*. Além disso, foi realizado análise de rede entre as estruturas em ambos os contextos de exposição, por modelo gráfico Gaussiano esparsa a partir da matriz de covariância (Friedman et al., 2008), bem como a aplicação de medidas de centralidade *Betweenness*, *OutDegree*, *CloseSness* e *InDegree*. O valor de p foi considerado significativo quando menor que 0,05 ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. EFEITOS COMPORTAMENTAIS

A análise dos dados comportamentais obtidos a partir do teste de DVEN (Figura 11) para o tempo no fundo (geotaxia) revelou um efeito principal significativo da dose [$F(2, 67) = 3,690$; $p = 0,030$], embora não tenham sido observados efeitos do tratamento (exposição) [$F(1, 67) = 0,462$; $p = 0,499$] ou da interação entre tratamento e dose [$F(2, 67) = 1,041$; $p = 0,359$]. As análises *post hoc* de Tukey, não revelaram diferenças significativas entre os pares de grupos (valores de $p > 0,065$) (Figura 11.A), mas houve diferença entre os grupos tratados com veículo e 30 mg/kg ($p = 0,023$), mas não em animais tratados com 10 mg/kg ($p = 0,491$). Isso sugere um aumento monotônico dose-dependente do comportamento tipo-ansiedade.

Para o tempo no topo (Figura 11.B), a análise revelou um efeito principal estatisticamente significativo da dose de 7-NI [$F(2, 67) = 6,693$; $p = 0,002$]. Tal efeito não foi observado quando avaliado o tratamento [$F(1, 67) = 0,262$; $p = 0,611$] ou a interação entre tratamento e dose [$F(2, 67) = 1,058$; $p = 0,353$]. O teste *post hoc* de Tukey revelou que animais tratados com 30 mg/kg de 7-NI e expostos à CAS apresentaram menor tempo no topo do aquário quando comparados aos animais do grupo tratado com veículo e exposto à CAS [$MD = 178,183$, $t(67) = 3,441$, $p_{\text{Tukey}} = 0,012$]. As demais comparações entre grupos não revelaram significância estatística (valores de $p_{\text{Tukey}} \geq 0,345$).

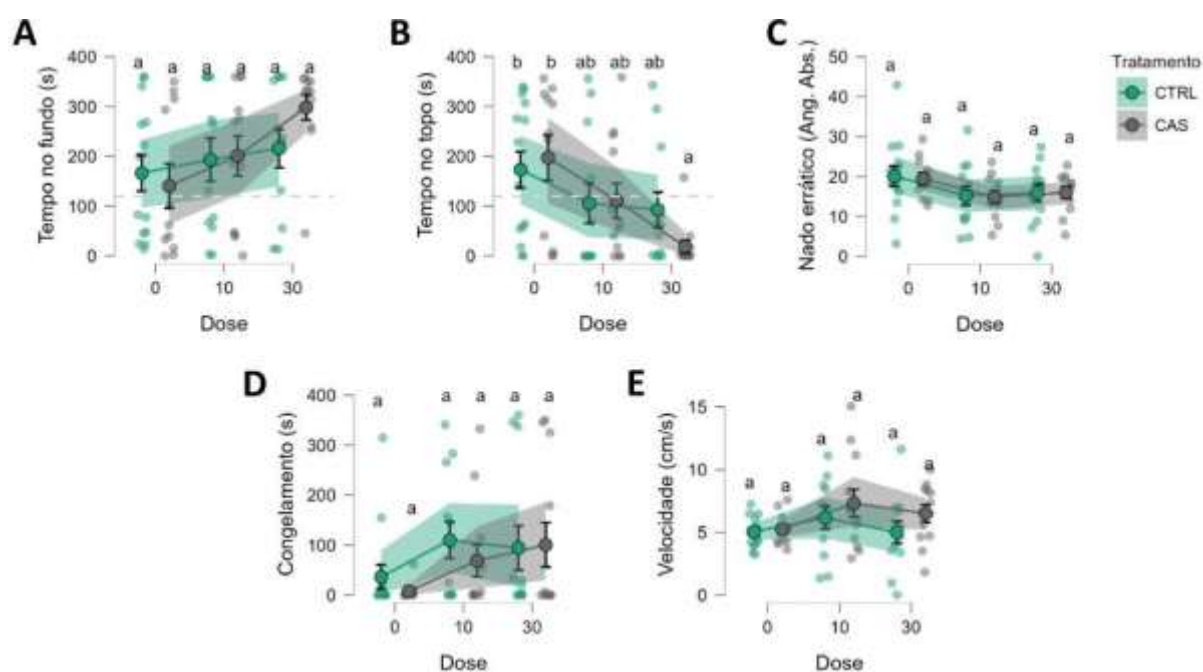
Para o nado errático (Figura 11.C), não houve efeito observável do tratamento [$F(1, 67) = 0,033$; $p = 0,857$], da dose [$F(2, 67) = 3,001$; $p = 0,056$] ou da interação entre tratamento e dose [$F(2, 67) = 0,017$; $p = 0,983$]. A análise *post hoc* também não demonstrou diferenças entre grupos (valores de $p_{\text{Tukey}} \geq 0,438$).

Quanto à duração dos eventos de congelamento (Figura 11.D), também não foram observados efeitos do tratamento [$F(1, 67) = 0,583$; $p = 0,448$], da dose [$F(2, 67) = 2,981$; $p =$

0,058] ou da interação entre tratamento e dose [$F(2, 67) = 0,258$; $p = 0,773$]. As análises *post hoc* não revelaram diferenças estatisticamente significativas entre nenhum dos pares de grupos para a variável analisada (valores de $p_{\text{Tukey}} \geq 0,317$). Para a velocidade (**Figura 11.E**), de forma semelhante, não foram observados efeitos significativos do tratamento [$F(1, 67) = 2,37$; $p = 0,13$], da dose [$F(2, 67) = 2,24$; $p = 0,12$] ou da interação entre tratamento e dose [$F(2, 67) = 0,40$; $p = 0,67$]. A análise *post hoc* corrobora com a ausência de diferenças significativas entre grupos (valores de $p_{\text{Tukey}} \geq 0,26$).

Figura 11

Efeito da Inibição de NOS-1 por 10 ou 30 mg/kg de 7-NI em Animais Expostos ao Controle ou à Substância de Alarme Coespecífica e Submetidos ao Teste de Distribuição Vertical Elicida pela Novidade



Nota. Avaliação da inibição de NOS-1 por 10 ou 30 mg/kg de 7-NI no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade em modelo de exposição à substância de alarme co-específica. (A) Tempo no fundo do aquário em segundos; (B) Tempo no topo do aquário em segundos;

(C) Medida indireta dos eventos de nado errático dada em ângulo absoluto; (D) Tempo de congelamento em segundos; (E) Velocidade de nado durante o teste em cm/s. CTRL: animais controle expostos à água destilada; CAS: animais expostos à substância de alarme co-específica. Médias indicadas com a mesma letra não diferem entre si, mas diferem daquelas com letras diferentes. Fonte: Arquivo pessoal (2025).

A análise das variáveis comportamentais obtidas a partir do teste de PCE (Figura 12) revela que, para o tempo no branco (Figura 12.A), não foi observado efeito do tratamento [$F(1, 68) = 0,033$; $p = 0,856$], mas diferenças estatisticamente significativas foram observadas para os fatores dose [$F(2, 68) = 6,226$; $p = 0,003$] e interação [$F(2, 68) = 6,959$; $p = 0,002$]. As análises *post hoc* revelaram diferenças entre os grupos VEH-CTRL vs VEH-CAS (MD = 285,14; $p_{\text{Tukey}} = 0,027$), VEH-CTRL vs Dose10-CTRL (MD = 392,06; $p_{\text{Tukey}} < 0,001$), e VEH-CTRL vs Dose30-CTRL (MD = 406,99; $p_{\text{Tukey}} < 0,001$). Esses resultados sugerem que a CAS aumenta o comportamento tipo-ansiedade nesse teste, e que o 7-NI provoca o mesmo efeito, com aumento monotônico dose-dependente de comportamento tipo-ansiedade.

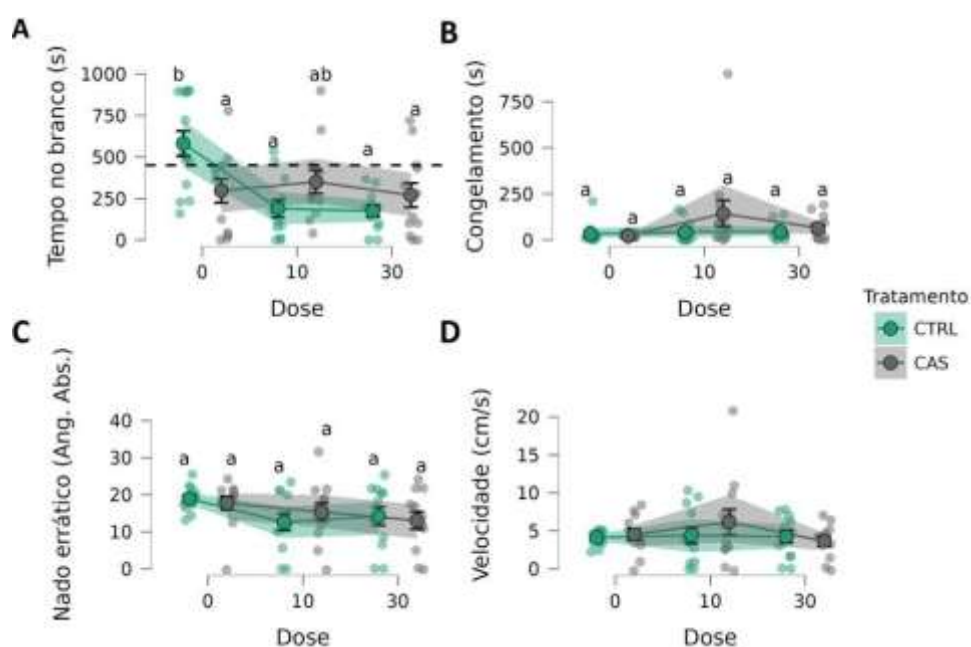
Para a variável congelamento (Figura 12.B), não foi observada diferença significativa para os fatores tratamento [$F(1, 68) = 2,110$; $p = 0,151$], dose [$F(2, 68) = 2,058$; $p = 0,136$] ou interação [$F(2, 68) = 1,585$; $p = 0,212$]. As análises *post hoc* atestam a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os pares de grupos (valores de $p_{\text{Tukey}} > 0,109$).

Para o nado errático (Figura 12.C), as análises não revelaram efeito do tratamento [$F(1, 68) = 0,004$; $p = 0,948$] e da interação [$F(2, 68) = 0,607$; $p = 0,548$], mas sim da dose [$F(2, 68) = 3,301$; $p = 0,043$]. Apesar do efeito significativo da dose, as análises *post hoc* não revelaram diferenças entre os pares de grupos (valores de $p_{\text{Tukey}} > 0,238$), mas houve diferença entre os grupos tratados com veículo e 30 mg/kg ($p = 0,43$), mas não em animais tratados com 10 mg/kg ($p = 0,094$). Isso sugere um aumento monotônico dose-dependente do comportamento tipo-ansiedade.

Quanto à velocidade (Figura 12.D), a análise estatística também não revelou efeitos do tratamento [$F(1, 68) = 0,452$; $p = 0,504$], da dose [$F(2, 68) = 1,058$; $p = 0,353$] ou da interação entre tratamento e dose [$F(2, 68) = 0,747$; $p = 0,478$]. As análises *post hoc* confirmaram a ausência de diferenças significativas (valores de $p_{\text{Tukey}} > 0,435$).

Figura 12

Efeito da Inibição de NOS-1 por 10 ou 30 mg/kg de 7-NI em Animais Expostos ao Controle ou à Substância de Alarme e Submetidos ao Teste de Preferência Claro-Escuro



Nota. Avaliação da inibição de NOS-1 por 10 ou 30 mg/kg de 7-NI no teste de preferência claro-escuro em modelo de exposição à substância de alarme co-específica. (A) Tempo no lado branco/claro do aquário em segundos; (B) Tempo de congelamento no lado claro em segundos; (C) Medida indireta dos eventos de nado errático realizados no lado claro, resultado dado em ângulo absoluto; (D) Velocidade de nado durante o teste em cm/s. CTRL: animais controle expostos à água destilada; CAS: animais expostos à substância de alarme co-

específica. Médias indicadas com a mesma letra não diferem entre si, mas diferem daquelas com letras diferentes. Fonte: Arquivo pessoal (2025).

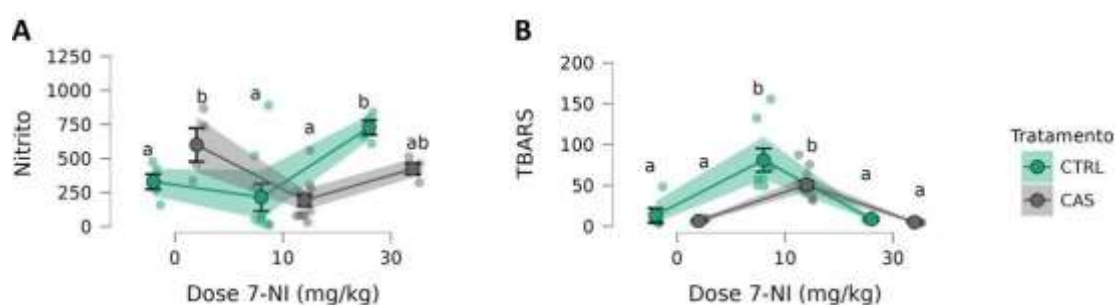
4.2. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A análise dos níveis de nitrito (Figura 13.A) nos tecidos de telencéfalo de animais dos diferentes grupos experimentais revelou efeitos estatísticos significativos da dose [$F(2, 32) = 12,075$; $p < 0,001$] e da interação entre tratamento e dose [$F(2, 32) = 4,383$; $p = 0,021$], mas não do tratamento [$F(1, 32) = 0,067$; $p = 0,798$]. As análises *post hoc* revelaram diferenças significativas para as comparações VEH-CTRL e VEH-CAS MD = -271,0, $t[gl = 32] = -2,022$, $p = 0,05$)

A análise dos níveis de TBARs (Figura 13.B) demonstrou efeito da dose [$F(2, 31) = 28,608$; $p < 0,001$], mas não do tratamento [$F(1, 31) = 2,748$; $p = 0,107$] e da interação entre tratamento e dose [$F(2, 31) = 1,338$; $p = 0,277$]. As análises *post hoc* revelaram diferenças significativas nas comparações entre os grupos os animais tratados com VEH e animais tratados com 10 mg/kg ($p_{\text{Tukey}} < 0,001$).

Figura 13

Efeito da Inibição de NOS-1 por 10 ou 30 mg/kg de 7-NI sobre os Níveis de Nitrito e de Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico em Animais Expostos ao Controle ou à Substância de Alarme



Nota. Avaliação dos níveis de nitrito (A) e de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (B) após inibição de NOS-1 por 10 ou 30 mg/kg de 7-NI em modelo de exposição à substância de alarme co-específica. TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; CTRL: animais controle expostos à água destilada; CAS: animais expostos à substância de alarme co-específica. Médias indicadas com a mesma letra não diferem entre si, mas diferem daquelas com letras diferentes. Fonte: Arquivo pessoal (2025).

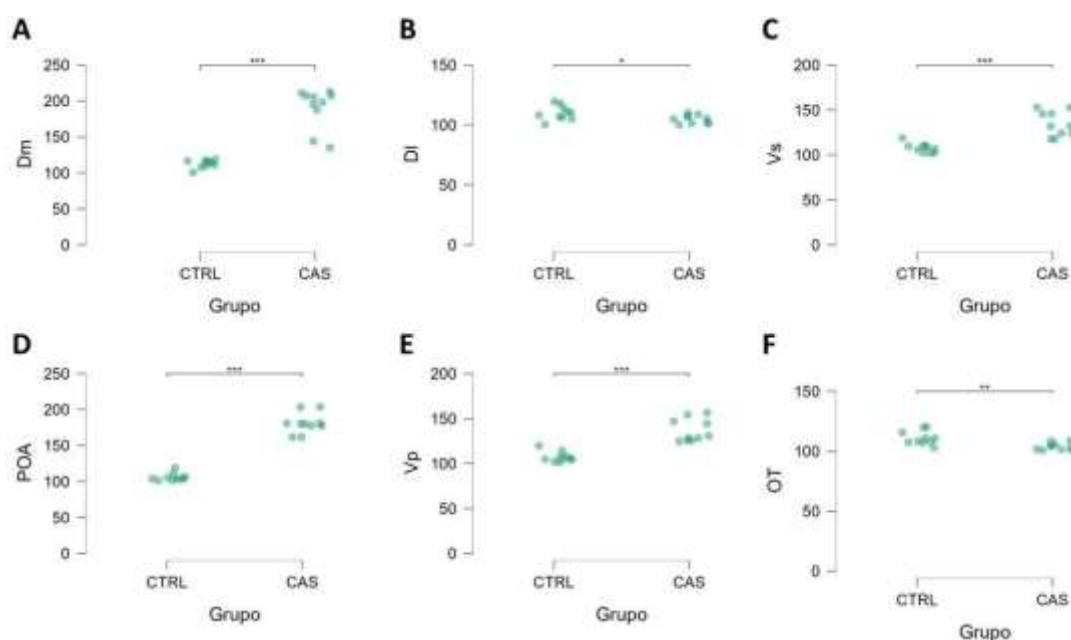
4.3. ATIVIDADE DE NADPH-DIAFORASE

A análise de densidade óptica, obtida das lâminas histológicas marcadas por NADPH-diaforase, revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos exposto à CAS e exposto ao controle em regiões encefálicas relacionadas a circuitos de defesa. A Figura 14 demonstra os resultados das diferenças observadas nas regiões Dm [$t(18) = -8,619$; $p < 0,001$; $d = -3,86$] (Figura 14.A), DI [$t(18) = 2,293$; $p = 0,034$; $d = 1,03$] (Figura 14.B), Vs [$t(18) = -$

5,826; $p < 0,001$; $d = -2,61$] (Figura 14.C), POA [$t(18) = -15,733$; $p < 0,001$; $d = -7,04$] (Figura 14.D), Vp [$t(18) = -6,771$; $p < 0,001$; $d = -3,03$] (Figura 14.E), e OT [$t(18) = 3,427$; $p = 0,003$; $d = 1,53$] (Figura 14.F), com aumento para todas as áreas, exceto DI e OT.

Figura 14

Efeito da Exposição Aguda à Substância de Alarme Coespecífica sobre a Ativação Neurônios Nitrérgicos Marcados por NADPH-diaforase e Mensurados por Densidade Óptica



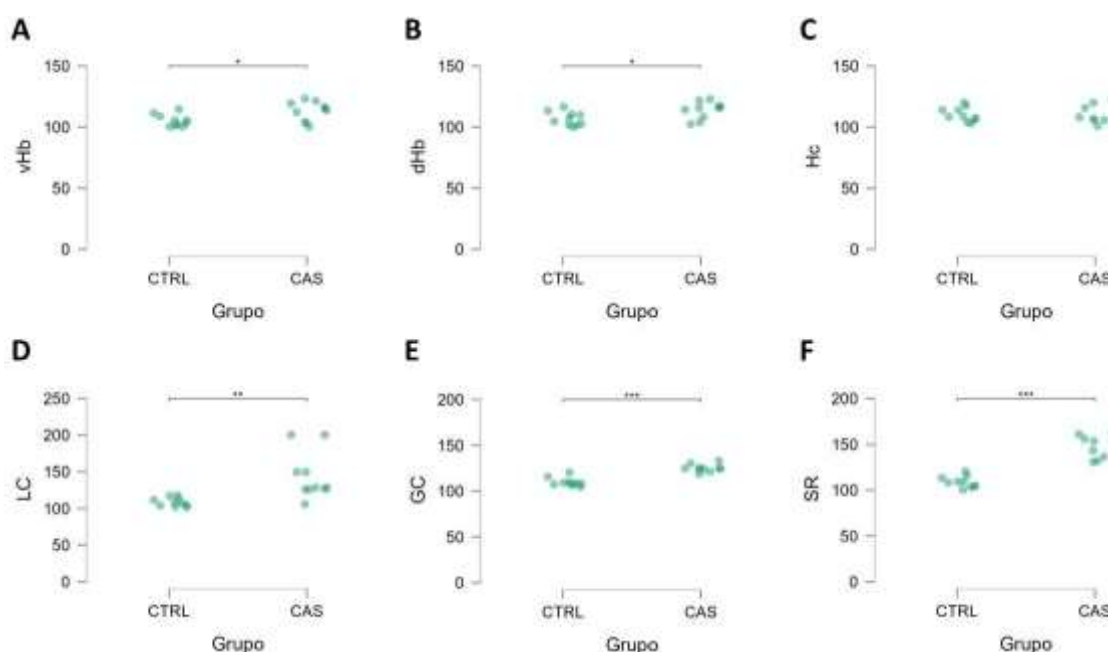
Nota. Avaliação da ativação nitrérgica de áreas encefálicas relacionadas aos circuitos de defesa medida em densidade óptica a partir da marcação por NADPH-diaforase. Dm: núcleo medial do telencéfalo dorsal; DI: núcleo dorsal do telencéfalo lateral; Vs: núcleo supracomissural do telencéfalo ventral; POA: área pré-óptica; Vp: núcleo pós comissural do telencéfalo ventral; OT: teto óptico. CTRL: animais controle expostos à água destilada; CAS: animais expostos à substância de alarme co-específica. Fonte: Arquivo pessoal (2025).

A Figura 15 demonstra as diferenças observadas nas regiões vHb [$t(18) = -2,647$; $p = 0,016$; $d = -1,18$] (Figura 15.A), dHb [$t(18) = -2,551$; $p = 0,020$; $d = -1,14$] (Figura 15.B), LC

[$t(18) = -3,452$; $p = 0,003$; $d = -1,54$] (Figura 15.D), GC [$t(18) = -7,946$; $p < 0,001$; $d = -3,55$] (Figura 15.E), e SR [$t(18) = -8,713$; $p < 0,001$; $d = -3,90$] (Figura 15.F). Em todos esses casos, foi observado aumento na atividade da NADPH-diaforase nessas áreas em animais expostos à CAS. Não foi observada diferença significativa para Hc [$t(18) = 0,166$; $p = 0,870$; $d = 0,07$] (Figura 15.C).

Figura 15

Efeito da Exposição Aguda à Substância de Alarme Coespecífica sobre a Ativação de Neurônios Nitrérgicos Marcados por NADPH-diaforase e Mensurados por Densidade Óptica

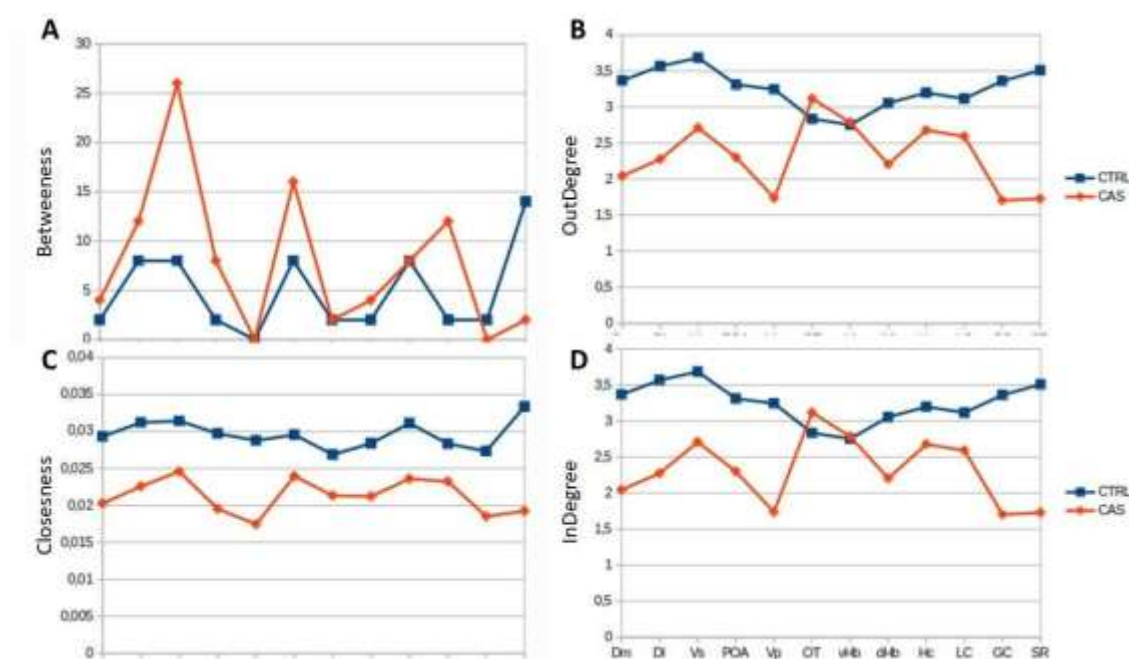


Nota. Avaliação da ativação nitrérgica de áreas encefálicas relacionadas aos circuitos de defesa medida em densidade óptica a partir da marcação por NADPH-diaforase. vHb: habenula ventral; dHb: habenula dorsal; Hc: hipotálamo caudal; LC: locus coeruleus; GC: grisea central; SR: núcleos da rafe. CTRL: animais controle expostos à água destilada; CAS: animais expostos à substância de alarme co-específica. Fonte: Arquivo pessoal (2025).

A **Figura 16** apresenta os gráficos das medidas de centralidade obtidas a partir da correlação entre os valores de densidade óptica das diferentes regiões marcadas por NADPH-diaforase. Observa-se Vs, OT e LC como áreas centrais no grupo de animais expostos à CAS, com base nas medidas *Betweeness* (Figura 16.A), *OutDegree* (Figura 16.B), *CloseSness* (Figura 16.C) e *InDegree* (Figura 16.D), enquanto, no grupo de animais expostos ao CTRL, a região da SR parece exercer maior centralidade quando avaliadas as quatro medidas.

Figura 16

Medidas de Centralidade Obtidas a Partir da Correlação entre as Densidades Ópticas das Regiões Marcadas por NADPH-diaforase



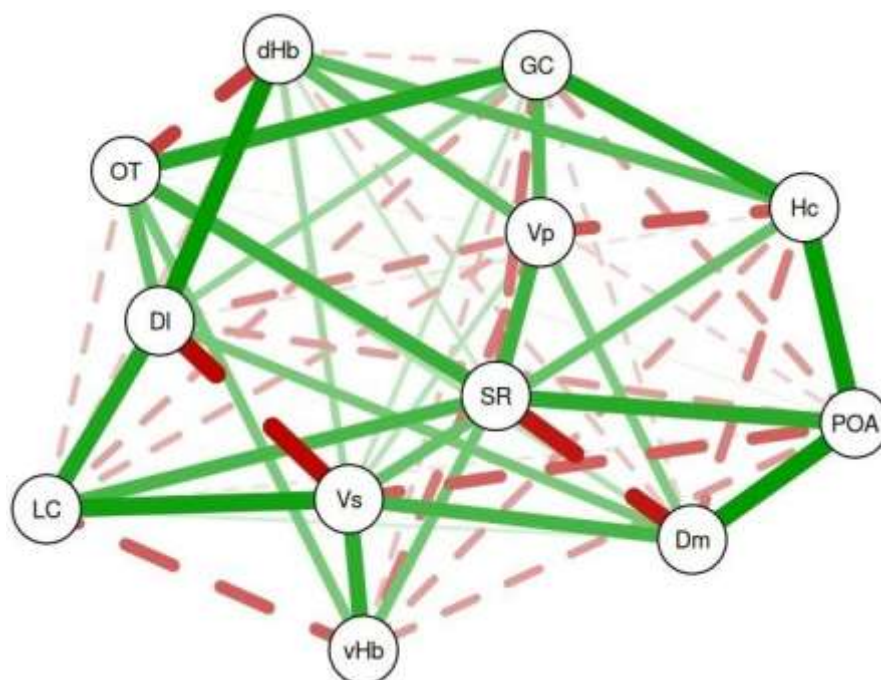
Nota. Medidas de centralidade baseadas na correlação entre os valores de densidade óptica obtidos da marcação das áreas encefálicas por NADPH-diaforase. As medidas avaliadas foram (A) *Betweeness*, (B) *OutDegree*, (C) *CloseSness* e (D) *InDegree*. Dm: núcleo medial do telencéfalo dorsal; Dl: núcleo dorsal do telencéfalo lateral; Vs: núcleo supracomissural do telencéfalo ventral; POA: área pré-óptica; Vp: núcleo pós comissural do telencéfalo ventral;

OT: teto óptico; vHb: habenula ventral; dHb: habenula dorsal; Hc: hipotálamo caudal; LC: locus coeruleus; GC: grisea central; SR: núcleos da rafe. CTRL: animais controle expostos à água destilada; CAS: animais expostos à substância de alarme co-específica. Fonte: Arquivo pessoal (2025).

A **Figura 17** apresenta a análise de rede a partir das correlações entre os valores de densidade óptica das diferentes áreas marcadas por NADPH-diaforase no grupo de animais expostos ao controle. São observados padrões de conectividade dispersos e sem agrupamentos marcantes entre as 12 estruturas encefálicas avaliadas.

Figura 17

Análise de Rede a Partir da Correlação entre os Valores de Densidade Óptica Obtidos das Áreas Marcadas por NADPH-diaforase de Animais Expostos ao Controle

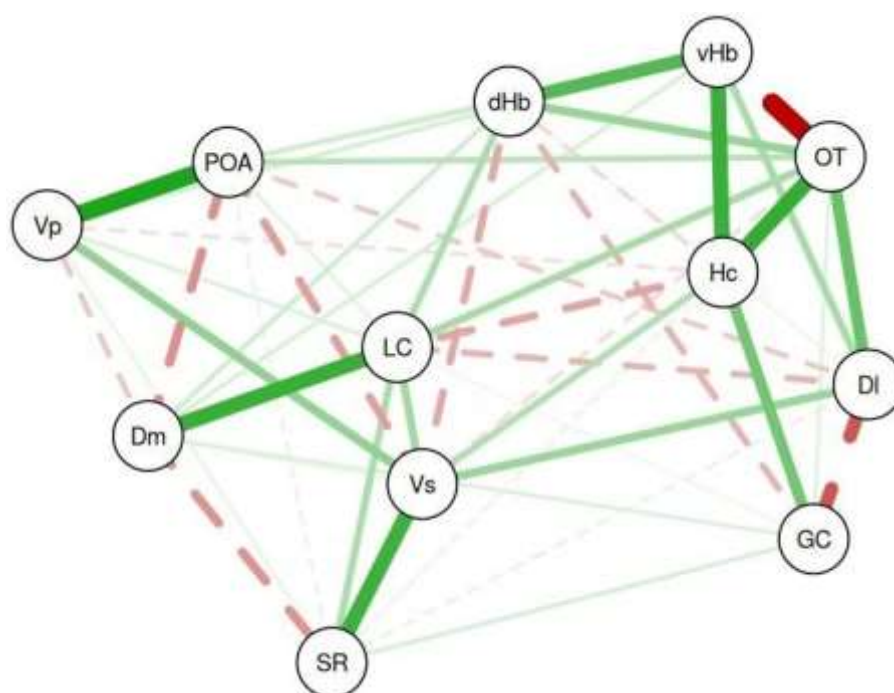


Nota. Padrões de conectividade entre áreas encefálicas marcadas por NADPH-diaforase e relacionadas aos circuitos de defesa em animais controle. Dm: núcleo medial do telencéfalo dorsal; Dl: núcleo dorsal do telencéfalo lateral; Vs: núcleo supracomissural do telencéfalo ventral; POA: área pré-óptica; Vp: núcleo pós comissural do telencéfalo ventral; OT: teto óptico; vHb: habenula ventral; dHb: habenula dorsal; Hc: hipotálamo caudal; LC: locus coeruleus; GC: grisea central; SR: núcleos da rafe. CTRL: animais controle expostos à água destilada; CAS: animais expostos à substância de alarme co-específica. Linhas verdes contínuas indicam correlação positiva, enquanto linhas vermelhas tracejadas indicam correlação negativa. A intensidade da cor e a largura das linhas são proporcionais à força da correlação. Fonte: Arquivo pessoal (2025).

A **Figura 18** demonstra a análise de rede a partir da correlação entre os valores de densidade óptica das estruturas encefálicas marcadas por NADPH-diaforase no grupo de animais expostos à CAS. Observa-se menor conectividade entre as 12 regiões associada à centralidade de Vs, LC e OT. Há uma correlação negativa entre OT e vHb, assim como entre Dl e GC.

Figura 18

Análise de Rede a Partir da Correlação entre os Valores de Densidade Óptica Obtidos das Áreas Marcadas por NADPH-diaforase de Animais Expostos à Substância de Alarme Coespecífica



Nota. Padrões de conectividade entre áreas encefálicas marcadas por NADPH-diaforase e relacionadas aos circuitos de defesa em animais expostos à substância de alarme co-específica. Dm: núcleo medial do telencéfalo dorsal; DI: núcleo dorsal do telencéfalo lateral; Vs: núcleo supracomissural do telencéfalo ventral; POA: área pré-óptica; Vp: núcleo pós comissural do telencéfalo ventral; OT: teto óptico; vHb: habenula ventral; dHb: habenula dorsal; Hc: hipotálamo caudal; LC: locus coeruleus; GC: grisea central; SR: núcleos da rafe. CTRL: animais controle expostos à água destilada; CAS: animais expostos à substância de alarme co-específica. Linhas verdes contínuas indicam correlação positiva, enquanto linhas

vermelhas tracejadas indicam correlação negativa. A intensidade da cor e a largura das linhas são proporcionais à força da correlação. Fonte: Arquivo pessoal (2025).

5. DISCUSSÃO

A avaliação da participação do sistema nitrérgico em respostas tipo ansiedade decorrentes de estresse agudo por CAS em *zebrafish* demonstrou que respostas comportamentais e bioquímicas são afetadas pela inibição da enzima NOS-1 por diferentes doses de 7-NI tanto nos grupos expostos ao controle quanto nos grupos expostos à CAS. Além disso, a análise histoquímica demonstrou diferenças nos padrões de conectividade a partir da ativação nitrérgica em áreas encefálicas relacionadas aos circuitos de defesa em animais expostos à CAS quando comparados aos padrões de conectividade de animais controle.

5.1. EFEITOS COMPORTAMENTAIS

A análise comportamental a partir do teste de DVEN demonstrou que, para a variável tempo no fundo, houve diferença estatisticamente significativa quando avaliada a dose, com uma tendência de aumento da geotaxia, preferência pelo fundo do aquário, em animais previamente tratados com 10 ou 30 mg/kg de 7-NI. No entanto, isso não se traduziu em diferenças entre os pares de grupos na análise post hoc, o que sugere um efeito de dose sutil ou mesmo que o poder estatístico – inclui fatores como o número amostral, a magnitude do efeito, a variabilidade dos dados e o nível de significância escolhido – foi insuficiente para detectar diferenças específicas entre pares de grupos.

Para a variável tempo no topo, foi observado efeito principal da dose, com tendência de diminuição do tempo no topo nos animais previamente tratados com 10 ou 30 mg/kg de 7-

NI em ambas as condições de exposição. Isto é, a inibição de NOS-1 por 7-NI aumentou o comportamento tipo ansiedade independente do tratamento/exposição.

Nos estudos de Lima-Maximino et al. (2020) e de Silva et al. (2021), animais controle submetidos a um período de aclimação no aparato antes da filmagem no teste de DVEN passaram, em média, menos que 100 segundos no topo do aquário (Lima-Maximino et al., 2020; Silva et al., 2021). No presente estudo, os animais testados no DVEN não passaram por um período de aclimação no aparato antes do início da filmagem, o que pode explicar o maior tempo passado no topo pelos animais controle. Maior tempo na superfície era esperado para tal grupo, porém em menor intensidade.

Gulati, Chakraborti e Ray (2009) observaram que as alterações comportamentais induzidas por estresse agudo de contenção (1h ou 6h) em ratos Wistar machos foram atenuadas frente ao tratamento com L-arginina, substrato para a produção de NO, realizado 60 minutos antes da exposição ao estresse. Isso sugere que o aumento da disponibilidade de NO pode estar associado à diminuição de comportamentos tipo ansiedade após um estresse agudo (Gulati et al., 2009), o que ampara os achados de que a inibição de NOS-1 por 7-NI e, portanto, a provável diminuição da disponibilidade de NO, pode aumentar o estado tipo ansioso em *zebrafish*.

De forma similar, o tratamento com a molsidomina, uma droga doadora de óxido nítrico (cuja metabolização libera NO), a uma dose intraperitoneal de 2 mg/kg, mas não de 1 ou 4 mg/kg, aumentou o tempo passado por ratos Wistar na área central do aparato durante o teste de campo aberto. Tal efeito tipo ansiolítico não diferiu estatisticamente quando comparado ao tratamento com diazepam, o que ampara o achado de que, nesse contexto experimental, o aumento da disponibilidade de NO esteve associado à diminuição de comportamentos tipo ansiedade (Kalouda & Pitsikas, 2015). Em *zebrafish*, a administração de nitroprussiato de sódio (SNP), outra droga doadora de óxido nítrico, parece exercer um efeito

em forma de U invertido sobre a escototaxia (preferência pelo lado preto do aquário) no teste de PCE, pois doses de 1 e 5 mg/kg aumentam o tempo no lado branco do aquário, enquanto a dose de 10 mg/kg cursa com diminuição desse tempo, resultados que sugerem uma modulação complexa dependente de níveis basais e estimulados de NO (Herculano et al., 2015).

Para as variáveis nado errático, congelamento e velocidade, os fatores analisados não produziram efeitos estatísticos significativos, embora tenham sido observadas tendências para o efeito da dose no nado errático ($p = 0,056$) e no congelamento ($p = 0,058$). A ausência de efeito nessas duas variáveis pode estar relacionada ao tamanho amostral, enquanto a ausência de alterações marcantes na velocidade sugere que a atividade motora dos animais não foi comprometida pela administração da droga.

As respostas observadas frente à inibição de NOS-1 no teste de DVEN parecem ocorrer independentemente do estado de alerta induzido pela CAS. No caso, o sistema nitrérgico parece modular a resposta à novidade mesmo na ausência de estímulos aversivos adicionais. Tanto o tempo no topo quanto a geotaxia foram sensíveis à inibição de NOS-1, porém para a geotaxia o efeito foi marginal, sem diferenças específicas. De qualquer forma, isso enfatiza a participação de NOS-1 em comportamentos de defesa e de exploração (de Sousa et al., 2024; Joung et al., 2012; Lisboa et al., 2013; Zhang et al., 2010).

No teste de PCE, animais previamente tratados com veículo e expostos ao controle apresentaram maior tempo no lado claro do aparato quando comparados aos demais grupos, com exceção do grupo de animais tratados com 10 mg/kg de 7-NI e expostos à CAS. Tal observação sugere que a replicação do modelo de exposição à CAS foi alcançada, pois, no desfecho principal de tempo gasto no lado claro do aparato teste, animais expostos à CAS passaram menos tempo que aqueles expostos ao controle (de Sousa et al., 2024; Lima et al., 2015). De forma similar ao teste de DVEN, as diferentes doses de 7-NI parecem ter

aumentado o estado tipo ansioso em ambas as condições experimentais de exposição. A exceção em relação aos animais previamente tratados com 10 mg/kg de 7-NI e expostos à CAS sugere uma modulação comportamental complexa exercida pelo sistema nitrérgico (Joung et al., 2012; Masood et al., 2003). Para a variável nado errático, foi observada diferença no fator dose, embora não tenham sido observadas diferenças nas comparações post hoc, o que pode estar relacionado ao poder estatístico do teste.

O tratamento com molsidomina intraperitoneal a 2 mg/kg também aumentou o tempo passado por ratos Wistar no compartimento branco do aparato durante o teste de claro-escuro (Kalouda & Pitsikas, 2015). Isso reforça a ideia de que o aumento da disponibilidade de NO pode estar relacionado à diminuição do comportamento tipo ansiedade. Doses de 1 ou 4 mg/kg não resultaram no efeito observado com 2 mg/kg (Kalouda & Pitsikas, 2015).

Em estudo de Joung et al. (2012), a inibição da síntese de NO, tanto pelo inibidor não seletivo de NOS (L-NAME; 10 mg/kg) quanto pelo inibidor seletivo da NOS-1 (7-NI; 10 mg/kg), aumentou o tempo e a frequência de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, assim como L-NAME foi capaz de diminuir os níveis de corticosterona e de metabólitos do NO no plasma de ratos submetidos ao estresse de contenção (Joung et al., 2012). Somado a isso, animais *knockdown* para NOS-1 – manifestam expressão desregulada, mas não completamente ausente, da enzima NOS-1 – também apresentaram diminuição de comportamentos tipo ansiedade em labirinto em cruz elevado (Wultsch et al., 2007). Esses dados amparam a participação do NO na diminuição de respostas tipo ansiedade.

Estudos que se utilizaram da inibição sistêmica (de Oliveira et al., 1997; Quock & Nguyen, 1992) ou local (Lisboa et al., 2013; Monzón et al., 2001), seja de forma não seletiva ou seletiva para NOS-1, sugerem efeito tipo ansiogênico frente a tal manipulação. No entanto, outros estudos, utilizando-se de administrações locais (Guimarães et al., 1994; Spolidório et al., 2007) ou sistêmicas (Dunn et al., 1998; Joung et al., 2012; Volke et al., 1995, 1997; Zhang

et al., 2010) de algum inibidor, não seletivo ou seletivo para NOS-1, resultaram em efeitos associados à ansiólise. Esses achados, quando avaliados em conjunto, sugerem a investigação de outros fatores (Joung et al., 2012; Lima-Maximino et al., 2025; Masood et al., 2003) que compõem as respostas observadas.

Quanto às variáveis congelamento e velocidade, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. O achado para a variável velocidade ampara a ideia de que a administração de 7-NI, em qualquer das doses, não resultou em alterações motoras que justificassem os demais achados.

5.2. EFEITOS BIOQUÍMICOS

A avaliação dos níveis de nitrito em tecidos de telencéfalo de animais dos diferentes grupos demonstrou aumento das concentrações de nitrito em animais previamente tratados com veículo e expostos à CAS quando comparados àqueles tratados com veículo e expostos ao controle. Esse achado atesta a replicação do modelo a nível bioquímico e ampara os achados dos desfechos principais de cada teste comportamental para os grupos em questão (Egan et al., 2009).

Quanto aos animais previamente tratados com 7-NI, uma dose de 10 mg/kg reduziu os níveis de nitrito em animais expostos à CAS, enquanto a dose de 30 mg/kg parece ter elevado esses níveis, dados que, assim como os dados de comportamento frente à administração de molsidomina (Kalouda & Pitsikas, 2015), parecem relacionados às proposições de Volke et al. (1995), em que a inibição de NOS não segue uma relação linear de causa e efeito, mas uma curva em forma de U invertido com relação aos comportamentos tipo ansiolíticos. Nesse sentido, assim como uma dose de 2 mg/kg, mas não de 1 ou 4 mg/kg, de molsidomina pode exercer um efeito tipo ansiolítico (Kalouda & Pitsikas, 2015), doses de 10 ou 30 mg/kg de 7-

NI parecem poder modular de forma antagônica as alterações nos níveis de nitrito observadas em *zebrafish*.

Os achados relacionados aos níveis de nitrito sugerem ainda que outras fontes de nitrito estejam sob inibição tônica da NOS-1, pois se o bloqueio de NOS-1 por uma dose alta de 7-NI cursa com aumento dos níveis de nitrito enquanto uma dose menor é capaz de diminuir esses níveis, infere-se que parte do nitrito não é produzido pela NOS-1. Logo, outras fontes de produção desse metabólito podem estar sob uma espécie de inibição tônica por ação de NOS-1 enquanto tal enzima esteja funcionando sem bloqueio. A retirada dessa inibição tônica, a exemplo da administração de 7-NI a 30 mg/kg, liberaria a produção de nitrito. Para isso, um possível mecanismo seria o resultado da metabolização do NO produzido via NOS-2. No entanto, a NOS-2 tem uma dinâmica temporal de funcionamento que não corresponde ao tempo em que foram realizados os testes, pois seu maior pico de atividade ocorre 90 minutos após a exposição a um estressor (de Sousa et al., 2024), o que é improvável de ocorrer dentro da escala temporal do experimento aqui realizado. Estudo de Watts et al. (2005) demonstrou aumento dos níveis extracelulares de nitrito após a infusão de L-NAME ou 7-NI por meio de uma sonda de microdiálise cerebral, sendo a resposta ao 7-NI bifásica. Diferentemente, a infusão dos inibidores em associação resultou em redução dos níveis de nitrito em comparação ao controle (Watts et al., 2005). Nesse caso, a atividade aumentada de uma isoforma específica pode compensar a inibição de outra isoforma, mecanismo ainda não elucidado (Watts et al., 2005). Esses achados amparam a ideia de inibição tônica por NOS-1.

A existência de diferença estatística quando avaliada a interação entre os fatores dose e tratamento sugere que, a nível bioquímico de observação, o estresse induzido pela CAS parece modular a sensibilidade ao 7-NI, particularmente na dose de 10 mg/kg, pois o grupo de animais previamente tratados com 10 mg/kg e exposto à CAS apresentou menores níveis de nitrito que o grupo de animais tratados com veículo e exposto à CAS. Esses achados, de

forma geral, amparam a ideia de que a modulação exercida pelo sistema nitrérgico pode depender de fatores como sexo, contexto e tipo de estresse (Joung et al. 2012; Masood et al., 2003; Lima-Maximino et al., 2025).

Os níveis de TBARs obtidos para cada grupo experimental também sugerem efeitos antagônicos para as diferentes doses de 7-NI sobre as alterações bioquímicas relacionadas ao estresse oxidativo. Animais previamente tratados com 10 mg/kg de 7-NI apresentaram maiores níveis de TBARs, enquanto o tratamento com 30 mg/kg parece ter revertido esse efeito em ambas as condições de exposição. Animais previamente tratados com veículo não apresentaram aumento nos níveis de TBARs em qualquer das duas condições de exposição.

Estudo de Şahin & Gümüşlü (2004) sugere que o estresse induz a ocorrência de peroxidação lipídica no cérebro. Segundo eles, ratos submetidos, simultaneamente, aos estresses de imobilização e de frio apresentaram maiores níveis de TBARs. Além disso, animais submetidos a apenas um desses estressores também apresentaram aumento dos níveis de TBARs, porém em menor intensidade. Estudo de Lima-Maximino et al. (2025) revela impactos de diferentes estressores sobre respostas comportamentais e bioquímicas em *zebrafish*; observou-se que exposição à CAS, ao estresse crônico imprevisível ou ao estresse de subordinação social produzem comportamentos tipo ansiedade e dano oxidativo, enquanto exposição ao estresse agudo de contenção, ao estresse de dominância ou ao aumento dos níveis de amônia não resulta nesses achados (Lima-Maximino et al., 2025). No presente trabalho, os dados apontam inconsistências relacionadas a isso, pois o estresse por CAS não resultou em aumento dos níveis de TBARs, enquanto o tratamento com 10 mg/kg resultou em aumento de tais níveis de forma independente da exposição ao estresse.

Na dose de 10 mg/kg de 7-NI, a diminuição dos níveis de nitrito acompanhou o aumento dos níveis de TBARs, enquanto na dose de 30 mg/kg de 7-NI o aumento dos níveis de nitrito esteve acompanhado da diminuição nos níveis de TBARs. A diminuição da

atividade da glutathiona peroxidase selênio-dependente (Se-GSH-Px) em ratos submetidos ao estresse de imobilização parece ser, em parte, explicada pelo mecanismo de aumento da síntese do NO (Madrigal et al., 2002), segundo o qual o selênio, presente no sítio ativo da Se-GSH-Px, reage de forma não enzimática com o peroxinitrito (ONOO^-), formado pela reação entre o NO e o O_2 , para neutralizá-lo (Şahin & Gümüşlü, 2004). Com base nisso, seria esperado que, em uma dose menor de 7-NI (10 mg/kg), a maior disponibilidade de NO via NOS-1, quando comparada a uma dose maior (30 mg/kg) (provável menor disponibilidade de NO via NOS-1), resultaria em aumento dos níveis de TBARs pelo mecanismo proposto por Şahin & Gümüşlü (2004). No entanto, a diminuição dos níveis de nitrito nos animais tratados com 10 mg/kg de 7-NI sugere que houve menor disponibilidade de NO nos animais em que se observou aumento dos níveis de TBARs. Isso reforça o complexo papel da modulação nitrérgica nas alterações bioquímicas investigadas.

Considerando toda essa complexidade de alterações comportamentais e bioquímicas resultantes da inibição de NOS-1 sobre animais expostos à CAS ou mesmo sobre animais controle, torna-se relevante a investigação da existência de ações tônicas e fásicas a partir da sinalização nitrérgica. Farrant & Nusser (2005) propuseram papéis tônicos e fásicos para as ações exercidas pelo GABA sobre receptores GABA-A, segundo as quais uma breve exposição a uma alta concentração de GABA liberado pelas vesículas pré-sinápticas caracteriza uma inibição fásica dos neurônios seguintes; de forma menos restrita espacial e temporalmente, o GABA pode “escapar” da fenda sináptica, ativando receptores em terminais pré-sinápticos ou em sinapses vizinhas no mesmo neurônio ou em neurônios adjacentes, sendo que baixas concentrações de GABA no espaço extracelular podem resultar na ativação tônica persistente de receptores GABA-A (Farrant & Nusser, 2005). Essa modulação complexa compõe respostas fisiológicas e comportamentais e pode estar correlacionada à sinalização nitrérgica ou mesmo refletir a realidade da sinalização por NO, haja vista que, em

um nível de observação celular, a inibição de NOS por L-NAME potencializa respostas tônicas e fásicas de receptores GABA-A em neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo (Gasulla & Calvo, 2015). No geral, sinais tônicos e fásicos de NO são necessários para a potenciação de longa duração (LTP) no hipocampo e parecem gerados, respectivamente, por eNOS e nNOS em ratos, a primeira isoforma nos vasos sanguíneos e a segunda nos neurônios (Hopper & Garthwaite, 2006), achados que suscitam a investigação de isoformas correspondentes em *zebrafish*.

Outro fator relevante para a complexidade do fenômeno é o sexo dos animais avaliados, pois tanto diferenças individuais quanto sexuais modulam o comportamento e as respostas farmacológicas a intervenções experimentais em *zebrafish* (dos Santos et al., 2021; Genario, de Abreu, et al., 2020; Genario, Giacomini, et al., 2020) e em outros vertebrados (Allegra et al., 2023; Hodes et al., 2024; Mariscal et al., 2023).

Além disso, enfatiza-se que a relevância da ameaça (relevância evolutiva), a controlabilidade do estresse (ação sobre a ameaça), a duração (aguda ou crônica) e o contexto social (dominância ou subordinação) parecem determinar se o estressor permanecerá nos limites da adaptabilidade ou se o organismo será submetido a uma sobrecarga homeostática (Lima-Maximino et al., 2025). Isto é, características do contexto estressante são importantes determinantes para a modulação exercida por sistemas como o nitrérgico em respostas tipo ansiedade.

5.3.EFEITOS SOBRE A ATIVIDADE DA NADPH-DIAFORASE NO CIRCUITO DE DEFESA

As áreas Dm, Vs, POA, Vp, vHb, dHb, GC e SR apresentaram maiores valores de densidade óptica na análise da marcação por NADPH-diaforase quando comparadas às áreas dos animais do grupo controle, o que sugere a participação da sinalização nitrérgica como mediadora nos circuitos de defesa compostos por essas estruturas frente à exposição à CAS (Giraldez-Perez et al., 2008). DI e OT apresentaram menores valores de densidade óptica nessa comparação, o que sugere diminuição da atividade nitrérgica nessas áreas no contexto de exposição à CAS (Giraldez-Perez et al., 2008).

As análises de rede sugerem que há um padrão difuso de ativação de neurônios nitrérgicos em condições basais, pois diversas áreas parecem estar ativadas em animais controle, com relevante papel da SR, devido à centralidade observada para essa estrutura. Nesse contexto, múltiplas regiões contribuem para a modulação das diferentes respostas que estejam ocorrendo no organismo, o que, em uma avaliação que considere as redes neurais em grande escala, está associado à rede de modo padrão (Uddin et al., 2019). Diferentemente, para animais submetidos ao estresse por CAS, parece haver uma predominância de circuitos relacionados à Vs (Porter & Mueller, 2020), LC (Li et al., 2018; Morris et al., 2020) e OT (Barker & Baier, 2015). Isto é, em um contexto de ameaça, circuitos defensivos passam a ter como interlocutores centrais as regiões Vs, LC e OT.

O bloqueio de receptores 5-HT por metergolina, ou a depleção de 5-HT por DL-para-clorofenilalanina (pCPA), demonstrou bloquear os efeitos comportamentais observados após exposição à CAS, o que sugere ação do sistema serotoninérgico sobre a inibição de respostas tipo medo após exposição à CAS (Lima-Maximino et al., 2020). Silva et al. (2021) sugerem que a realização do teste comportamental após a exposição envolve um estado de potencial ameaça no qual é observado um “retorno à normalidade”, enquanto uma exploração cautelosa

do ambiente é realizada pelo animal (Silva et al., 2021). Esse contexto parece ser relacionado a comportamentos tipo ansiedade (Lima-Maximino et al., 2020).

Como a análise de rede demonstrou que a exposição à CAS leva a uma diminuição da centralidade da SR, região principalmente composta por neurônios serotoninérgicos, enquanto é observado um aumento da centralidade de LC, sugere-se que, durante um evento estressor tal qual a exposição à CAS, a SR perca importância para o circuito de defesa, haja vista que o estímulo ainda está presente e, portanto, o organismo necessita de uma resposta de defesa relacionada ao medo. Na verdade, um aumento nos níveis de 5-HT em *zebrafish* parece exercer efeito sobre a diminuição do congelamento e de demais comportamentos incompatíveis com a exploração cuidadosa (avaliação de risco) após a exposição a um estímulo aversivo, sob mediação dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} (Lima-Maximino et al., 2020; Silva et al., 2021). Como os animais submetidos aos experimentos de histoquímica foram eutanasiados imediatamente após a exposição, sem que algum teste comportamental subsequente fosse realizado, os dados obtidos da ativação de áreas nitrérgicas refletem um contexto de exposição, o que concorda com a ideia de que, frente à exposição ao estressor, é observada uma diminuição de centralidade serotoninérgica em circuitos de defesa. Se a influência da 5-HT é funcionalmente desacoplada das demais áreas relacionadas ao circuito de defesa no contexto em questão, observa-se maior acoplamento funcional de outro conjunto de áreas capazes de influenciar o comportamento, como observado pelos dados de centralidade e conectividade funcional. Trata-se de uma hipótese a ser testada, pois a análise de rede por si só não estabelece direção causal.

Para interagir de forma adaptativa com um ambiente em constante mudança (Cisek & Kalaska, 2010), alguns processos cognitivos podem ser priorizados (Young et al., 2017). Nesse sentido, a performance cognitiva muda em função da ativação (*arousal*) por algum estressor (Young et al., 2017). No caso de uma possível ameaça, por exemplo, é ideal que se

identifique o local do estímulo antes que detalhes acerca de características da ameaça sejam elaborados (Young et al., 2017). Para a execução de respostas apropriadas a isso, a rede de saliência parece fundamental (Seeley et al., 2007), haja vista que apresenta conectividade funcional com áreas subcorticais e límbicas relacionadas à ansiedade, à recompensa e à motivação (Bressler & Menon, 2010).

Os centros corticais que compõem a rede de saliência em humanos envolvem o córtex cingulado anterior e o córtex insular anterior ventral. Quanto às estruturas subcorticais, inclui-se amígdala, hipotálamo, estriado ventral, tálamo e núcleos do tronco encefálico (Seeley, 2019; Uddin, 2016), estruturas homólogas ou relacionadas àquelas identificadas como influentes no presente estudo. Sugere-se a tal rede uma função de domínio geral necessária à detecção de estímulos relevantes ao controle homeostático (Seeley, 2019), ou seja, há grande importância para contextos de estresse.

No estudo de Faustino et al. (2017), animais controle apresentaram conectividade funcional entre as regiões Dm, Vv, Vs e POA, enquanto animais expostos à CAS apresentaram diminuição da correlação entre essas áreas (Faustino et al., 2017). De forma semelhante, a análise de rede do presente trabalho demonstrou maior correlação entre essas estruturas em animais controle quando comparados àqueles expostos à CAS. Somado a isso, animais expostos à CAS apresentaram apenas co-ativação de Dm-Vs e de Vv-Vs (Faustino et al., 2017), diferente dos resultados da presente análise de rede, em que se observou maior força correlacional para Dm-LC e Vs-SR. Essas diferenças podem se relacionar ao fato de que Faustino et al. (2017) focaram a atenção somente em 4 áreas, permitindo melhor poder estatístico para detectar efeitos pequenos que podem passar despercebidos quando muitas áreas são comparadas.

Baker & Wong (2021) sugerem Dm como centro de processamento associativo para o medo e Vs como parte da via de saída para respostas defensivas em *zebrafish*. Nesse estudo,

os animais foram subdivididos em duas populações, aqueles proativos – mais propensos ao risco e que apresentam aquisição mais rápida em paradigmas de recompensa – e os reativos – mais avessos ao risco e que apresentam aquisição mais rápida em paradigmas aversivos – e submetidos ao paradigma de condicionamento aversivo com a utilização da CAS como estímulo aversivo incondicionado (Baker & Wong, 2021). Os autores demonstraram um aumento da expressão de genes relacionados à plasticidade neural (*npas4a* e *gabbr1a*) em Dm, Dl e Vs em animais da linhagem de alto comportamento estacionário (HSB), aqueles reativos (Baker & Wong, 2021). Somado a isso, estudo com roedores demonstrou que, em uma população de neurônios do BNST – área a qual Vs é parcialmente homólogo – aumentos de atividade e de expressão de *npas4* estiveram associados ao aumento da resiliência ao estresse e à prevenção de um fenótipo tipo transtorno de estresse pós-traumático (Henckens et al., 2017), o que sugere o aumento da expressão de *npas4a* em Vs como aparentemente relacionado à forma como os indivíduos experienciam e executam estratégias para lidar com o estresse por CAS (Baker & Wong, 2021). Assim, do ponto de vista da organização do comportamento defensivo, Dm (homólogo à BLA) parece uma área mais associativa, enquanto Vs (relacionado à amígdala central expandida ou autonômica) apresenta maior relação, ainda que não só isso, com a seleção do comportamento/estratégia defensivo. Isto é, a determinação do comportamento defensivo mais adequado ao contexto, que pode ser avaliação de risco, congelamento ou fuga.

Somado a isso, a exposição a um estressor agudo ativa a liberação de noradrenalina pelo LC (Valentino & Van Bockstaele, 2008), o que altera a sinalização em receptores adrenérgicos e a funcionalidade de estruturas relacionadas à rede neural de saliência, como a amígdala (Arnsten, 1998). Isso se relaciona ao aumento da centralidade de LC observado em animais expostos à CAS, bem como ao aumento da força correlacional entre Dm e LC nesses animais, haja vista que Dm é homólogo à amígdala. Além disso, a exposição ao estresse

agudo aumenta a conectividade entre áreas que compõem a rede neural de saliência, sendo que antagonistas de receptores adrenérgicos reduzem essa resposta, o que reforça a participação da noradrenalina – e, portanto, do LC – como mediadora nesse contexto (Hermans et al., 2011). De forma funcional, a liberação de noradrenalina pelo LC no contexto de ativação da rede neural de saliência parece atuar para priorizar a percepção e a memória de estímulos de relevância (Mather et al., 2016), o que concorda com as necessidades impostas em caso de respostas defensivas.

Ainda no estudo de Faustino et al. (2017), Dm, Vv, Vs e POA apresentaram aumento da expressão de c-Fos, marcador de atividade neural, após exposição à CAS (Faustino et al., 2017), dado que ampara os achados de densidade óptica para tais regiões no presente estudo. Quanto à funcionalidade, essas áreas parecem compor circuitos relacionados à detecção e/ou processamento de estímulo aversivo e/ou seleção de estratégias comportamentais em *zebrafish* (Ruhl et al., 2017), o que é fundamental para o sucesso de respostas de defesa. Em contraposição a isso, estudo de Carvalho et al. (2013) indica ausência de alterações na expressão de c-Fos ou *egr1* após exposição à CAS em *zebrafish*. Ao analisarem a expressão de c-Fos após exposição à CAS, Ruhl et al. (2017) não observaram aumentos nas regiões Dl, núcleo dorsal do telencéfalo ventral (Vd), Hb ou tálamo, resultado que se opõe aos achados de densidade óptica para Dl, em que houve diminuição, e Hb, em que se observou aumento, com base na atividade de NADPH-diaforase.

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho se opõem à hipótese de que, em um contexto de estresse agudo por CAS, animais previamente tratados com 7-NI apresentariam, obrigatoriamente, diminuição das respostas tipo ansiedade observadas. Na verdade, a modulação via sistema nitrérgico parece exercer tanto um efeito ansiogênico quanto um efeito

ansiolítico, o que deve decorrer de fatores contextuais (Lima-Maximino et al., 2025), fisiológicos (Farrant & Nusser, 2005; Gasulla & Calvo, 2015; Hopper & Garthwaite, 2006) e sexuais (dos Santos et al., 2021; Genario, Giacomini, et al., 2020). Os dados poderiam indicar um efeito em U invertido, em que uma das doses resultaria em um achado oposto àquele observado com a outra dose (Volke et al., 1995). No entanto, ambas as doses utilizadas nesse contexto experimental parecem ter produzido um maior estado de respostas tipo ansiedade, sendo a dose de 10 mg/kg de 7-NI, a nível comportamental de observação, responsável por um estado intermediário entre o controle e o efeito observado com a dose de 30 mg/kg. Isso leva à possibilidade de existência de efeitos tônicos e fásicos na sinalização nitrérgica (Farrant & Nusser, 2005; Gasulla & Calvo, 2015; Hopper & Garthwaite, 2006) e de diferenças sexuais (dos Santos et al., 2021; Genario et al., 2020) marcantes.

Em um nível observacional bioquímico, as diferentes doses de 7-NI parecem modular de forma antagônica as alterações nas concentrações de nitrito, com possibilidade de inibição tônica por NOS-1 (Watts et al., 2005). De forma semelhante, as concentrações de TBARs também parecem responder de modo antagônico, sendo opostas àquelas alterações observadas nos níveis de nitrito; a diminuição nos níveis de nitrito com a menor dose de 7-NI parece estar associada ao aumento nas concentrações de TBARs, enquanto o aumento nos níveis de nitrito esteve associado à diminuição das concentrações de TBARs. Nesse sentido, estudos posteriores devem investigar o impacto de possíveis ações tônicas e fásicas da sinalização nitrérgica sobre respostas de defesa, bem como a influência do sexo, da relevância da ameaça, da controlabilidade do estresse, da duração do estresse e do contexto social nessas respostas em *zebrafish*.

Quanto a análise histoquímica, a exposição à CAS leva a uma maior atividade nitrérgica nas áreas Dm, Vs, POA, Vp, vHb, dHb, GC e SR, enquanto menor atividade é

observada em Dl e OT. Com base na análise de rede, os padrões de correlação entre a atividade nitrérgica de áreas encefálicas se alteram frente à exposição à CAS em *zebrafish*, parece ocorrer uma diminuição da centralidade da SR, enquanto é observado um aumento da centralidade de LC para o circuito de defesa, consistente com a presença do estímulo aversivo no ambiente, momento em que o organismo necessita de uma resposta de defesa relacionada ao medo.

No geral, a isoforma NOS-1 parece viabilizar a produção de NO responsável por modular respostas tipo ansiedade frente ao estresse agudo por CAS em *zebrafish*, e isso inclui diferentes ajustes comportamentais e bioquímicos, sejam eles direcionados à ansiogênese ou à ansiólise. Além disso, a exposição à CAS leva à alteração dos padrões de atividade em regiões encefálicas associadas a circuitos de defesa, caracterizada por uma maior atividade nitrérgica em Dm, Vs, POA, Vp, vHb, dHb, GC e SR, e pela diminuição de tal atividade em Dl e OT. A estrutura SR perde centralidade no circuito de defesa frente a exposição à CAS, momento a partir do qual as estruturas Vs, LC e OT manifestam maior centralidade.

REFERÊNCIAS

- Agorastos, A., & Chrousos, G. P. (2022). The neuroendocrinology of stress: The stress-related continuum of chronic disease development. *Molecular Psychiatry*, 27(1), 502–513. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01224-9>
- Allegra, S., Chiara, F., Grazia, D. D., Gaspari, M., & Francia, S. D. (2023). Evaluation of Sex Differences in Preclinical Pharmacology Research: How Far Is Left to Go? *Pharmaceuticals*, 16(6). <https://doi.org/10.3390/ph16060786>
- Alsop, D., & Vijayan, M. (2009). The zebrafish stress axis: Molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event. *General and Comparative Endocrinology*, 161(1), 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.09.011>
- Aluru, N., & Vijayan, M. M. (2009). Stress transcriptomics in fish: A role for genomic cortisol signaling. *General and Comparative Endocrinology*, 164(2–3), 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.020>
- Arnsten, A. F. T. (1998). The Biology of Being Frazzled. *Science*, 280(5370), 1711–1712. <https://doi.org/10.1126/science.280.5370.1711>
- Baker, M. R., & Wong, R. Y. (2021). Npas4a expression in the teleost forebrain is associated with stress coping style differences in fear learning. *Scientific Reports*, 11(1), 12074. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91495-7>
- Barker, A. J., & Baier, H. (2015). Sensorimotor Decision Making in the Zebrafish Tectum. *Current Biology*, 25(21), 2804–2814. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.055>
- Bateson, M., Brilot, B., & Nettle, D. (2011). Anxiety: An evolutionary approach. *Canadian Journal of Psychiatry. Revue Canadienne De Psychiatrie*, 56(12), 707–715. <https://doi.org/10.1177/070674371105601202>

- Beijamini, V., & Guimarães, F. S. (2006a). Activation of neurons containing the enzyme nitric oxide synthase following exposure to an elevated plus maze. *Brain Research Bulletin*, 69(4), 347–355. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.02.006>
- Beijamini, V., & Guimarães, F. S. (2006b). C-Fos expression increase in NADPH-diaphorase positive neurons after exposure to a live cat. *Behavioural Brain Research*, 170(1), 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.01.025>
- Bonassoli, V. T., Milani, H., & de Oliveira, R. M. W. (2011). Ethanol withdrawal activates nitric oxide-producing neurons in anxiety-related brain areas. *Alcohol*, 45(7), 641–652. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2010.11.007>
- Bordieri, L., Bonaccorsi di Patti, M. C., Miele, R., & Cioni, C. (2005). Partial cloning of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) cDNA and regional distribution of nNOS mRNA in the central nervous system of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Molecular Brain Research*, 142(2), 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2005.09.018>
- Brase, G. L. (2021). Adaptive problems. Em *The SAGE handbook of evolutionary psychology: Foundations of evolutionary psychology* (p. 34–55). Sage Reference. <https://doi.org/10.4135/9781529739442.n3>
- Bressler, S. L., & Menon, V. (2010). Large-scale brain networks in cognition: Emerging methods and principles. *Trends in Cognitive Sciences*, 14(6), 277–290. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2010.04.004>
- Cachat, J., Stewart, A., Grossman, L., Gaikwad, S., Kadri, F., Chung, K. M., Wu, N., Wong, K., Roy, S., Suciu, C., Goodspeed, J., Elegante, M., Bartels, B., Elkhayat, S., Tien, D., Tan, J., Denmark, A., Gilder, T., Kyzar, E., ... Kalueff, A. V. (2010). Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nature Protocols*, 5(11), 1786–1799. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.140>

- CCAC. (2005). *Guidelines on the care and use of fish in research, teaching and testing*. Canadian Council on Animal Care.
- Cisek, P., & Kalaska, J. F. (2010). Neural mechanisms for interacting with a world full of action choices. *Annual Review of Neuroscience*, 33, 269–298. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135409>
- Dal Santo, G., Conterato, G. M. M., Barcellos, L. J. G., Rosemberg, D. B., & Piato, A. L. (2014). Acute restraint stress induces an imbalance in the oxidative status of the zebrafish brain. *Neuroscience Letters*, 558, 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.11.011>
- de Carvalho, T. S., Cardoso, P. B., Santos-Silva, M., Lima-Bastos, S., Luz, W. L., Assad, N., Kauffmann, N., Passos, A., Brasil, A., Bahia, C. P., Moraes, S., Gouveia, A., de Jesus Oliveira Batista, E., Oliveira, K. R. M. H., & Herculano, A. M. (2019). Oxidative Stress Mediates Anxiety-Like Behavior Induced by High Caffeine Intake in Zebrafish: Protective Effect of Alpha-Tocopherol. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 8419810. <https://doi.org/10.1155/2019/8419810>
- de Leon, J. A. D., & Borges, C. R. (2020). Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (159), 10.3791/61122. <https://doi.org/10.3791/61122>
- de Oliveira, C. L., Del Bel, E. A., & Guimarães, F. S. (1997). Effects of L-NOARG on plus-maze performance in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 56(1), 55–59. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(96\)00156-6](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(96)00156-6)
- de Sousa, E. B., Heymbeeck, J. A. A., Feitosa, L. M., Xavier, A. G. O., dos Santos Campos, K., do Socorro dos Santos Rodrigues, L., de Freitas, L. M., do Carmo Silva, R. X., Ikeda, S. R., de Nazaré dos Santos Silva, S., Rocha, S. P., do Nascimento, W. L., da Silva Moraes, E. R., Herculano, A. M., Maximino, C., Pereira, A., & Lima-Maximino,

- M. (2024). Activation of NOS-cGMP pathways promotes stress-induced sensitization of behavioral responses in zebrafish. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 243, 173816. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2024.173816>
- dos Santos, B. E., Giacomini, A. C. V. V., Marcon, L., Demin, K. A., Strekalova, T., de Abreu, M. S., & Kalueff, A. V. (2021). Sex differences shape zebrafish performance in a battery of anxiety tests and in response to acute scopolamine treatment. *Neuroscience Letters*, 759, 135993. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135993>
- Dunn, R. W., Reed, T. A., Copeland, P. D., & Frye, C. A. (1998). The nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole displays enhanced anxiolytic efficacy without tolerance in rats following subchronic administration. *Neuropharmacology*, 37(7), 899–904. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(98\)00076-8](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(98)00076-8)
- Egan, R. J., Bergner, C. L., Hart, P. C., Cachat, J. M., Canavello, P. R., Elegante, M. F., Elkhayat, S. I., Bartels, B. K., Tien, A. K., Tien, D. H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z., & Kalueff, A. V. (2009). Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 205(1), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.022>
- Farrant, M., & Nusser, Z. (2005). Variations on an inhibitory theme: Phasic and tonic activation of GABAA receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(3), 215–229. <https://doi.org/10.1038/nrn1625>
- Faustino, A. I., Tacão-Monteiro, A., & Oliveira, R. F. (2017). Mechanisms of social buffering of fear in zebrafish. *Scientific Reports*, 7(1), 44329. <https://doi.org/10.1038/srep44329>
- Friedman, J., Hastie, T., & Tibshirani, R. (2008). Sparse inverse covariance estimation with the graphical lasso. *Biostatistics*, 9(3), 432–441. <https://doi.org/10.1093/biostatistics/kxm045>

- Garthwaite, J. (2008). Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *The European Journal of Neuroscience*, 27(11), 2783–2802. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06285.x>
- Gasulla, J., & Calvo, D. J. (2015). Enhancement of tonic and phasic GABAergic currents following nitric oxide synthase inhibition in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuroscience Letters*, 590, 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.01.058>
- Genario, R., de Abreu, M. S., Giacomini, A. C. V. V., Demin, K. A., & Kalueff, A. V. (2020). Sex differences in behavior and neuropharmacology of zebrafish. *European Journal of Neuroscience*, 52(1), 2586–2603. <https://doi.org/10.1111/ejn.14438>
- Genario, R., Giacomini, A. C. V. V., de Abreu, M. S., Marcon, L., Demin, K. A., & Kalueff, A. V. (2020). Sex differences in adult zebrafish anxiolytic-like responses to diazepam and melatonin. *Neuroscience Letters*, 714, 134548. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134548>
- Giraldez-Perez, R. M., Gaytan, S. P., Ruano, D., Torres, B., & Pasaro, R. (2008). Distribution of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase reactivity in the central nervous system of the goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 35(1), 12–32. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2007.05.007>
- Goodson, J. L., & Kingsbury, M. A. (2013). What's in a name? Considerations of homologies and nomenclature for vertebrate social behavior networks. *Hormones and Behavior*, 64(1), 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.05.006>
- Griess, J. P. (1864). XVIII. On a new series of bodies in which nitrogen is substituted for hydrogen. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, (154), 667–731. <https://doi.org/10.1098/rstl.1864.0018>

- Guimarães, F. S., de Aguiar, J. C., Del Bel, E. A., & Ballejo, G. (1994). Anxiolytic effect of nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the dorsal central grey. *NeuroReport*, 5(15), 1929.
- Guix, F. X., Uribesalgo, I., Coma, M., & Muñoz, F. J. (2005). The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Progress in Neurobiology*, 76(2), 126–152. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.06.001>
- Gulati, K., Chakraborti, A., & Ray, A. (2009). Differential role of nitric oxide (NO) in acute and chronic stress induced neurobehavioral modulation and oxidative injury in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92(2), 272–276. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.12.010>
- Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*, 41(12), 1819–1828. <https://doi.org/10.1093/clinchem/41.12.1819>
- Hamilton, F., Baird, S. F., & Swaine, J. (with Smithsonian Libraries). (1822). *An account of the fishes found in the river Ganges and its branches*. Edinburgh : Printed for Archibald Constable and Company ; London : Hurst, Robinson, and Co. <http://archive.org/details/accountoffishes00hami>
- Henckens, M. J. a. G., Printz, Y., Shamgar, U., Dine, J., Lebow, M., Drori, Y., Kuehne, C., Kolarz, A., Eder, M., Deussing, J. M., Justice, N. J., Yizhar, O., & Chen, A. (2017). CRF receptor type 2 neurons in the posterior bed nucleus of the stria terminalis critically contribute to stress recovery. *Molecular Psychiatry*, 22(12), 1691–1700. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.133>
- Herculano, A. M., Puty, B., Miranda, V., Lima, M. G., & Maximino, C. (2015). Interactions between serotonin and glutamate–nitric oxide pathways in zebrafish scototaxis. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 129, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.12.005>

- Hermans, E. J., Van Marle, H. J. F., Ossewaarde, L., Henckens, M. J. A. G., Qin, S., Van Kesteren, M. T. R., Schoots, V. C., Cousijn, H., Rijpkema, M., Oostenveld, R., & Fernández, G. (2011). Stress-Related Noradrenergic Activity Prompts Large-Scale Neural Network Reconfiguration. *Science*, 334(6059), 1151–1153. <https://doi.org/10.1126/science.1209603>
- Hetrick, E. M., & Schoenfish, M. H. (2009). Analytical Chemistry of Nitric Oxide. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2(Volume 2, 2009), 409–433. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-060908-155146>
- Heymbeeck, J. A. A., De Sousa, E. B., Lima-Maximino, M., Pereira, A., & Maximino, C. (2025). Nitrgenic Signaling Mediation of Neurobehavioral Responses to Stress in Zebrafish. *Journal of Neurochemistry*, 169(10), e70254. <https://doi.org/10.1111/jnc.70254>
- Hodes, G. E., Bangasser, D., Sotiropoulos, I., Kokras, N., & Dalla, C. (2024). Sex Differences in Stress Response: Classical Mechanisms and Beyond. *Current Neuropharmacology*, 22(3), 475–494. <https://doi.org/10.2174/1570159X22666231005090134>
- Holmqvist, B., Ebbesson, L., & Alm, P. (2007). Nitric oxide and the zebrafish (*Danio rerio*): Developmental neurobiology and brain neurogenesis. In *Advances in Experimental Biology* (Vol. 1, p. 229–465). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1872-2423\(07\)01011-3](https://doi.org/10.1016/S1872-2423(07)01011-3)
- Holmqvist, B., Ellingsen, B., Alm, P., Forsell, J., Oyan, A. M., Goksøyr, A., Fjose, A., & Seo, H. C. (2000). Identification and distribution of nitric oxide synthase in the brain of adult zebrafish. *Neuroscience Letters*, 292(2), 119–122. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(00\)01460-9](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(00)01460-9)

- Hope, B. T., Michael, G. J., Knigge, K. M., & Vincent, S. R. (1991). Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(7), 2811–2814. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.7.2811>
- Hopper, R. A., & Garthwaite, J. (2006). Tonic and Phasic Nitric Oxide Signals in Hippocampal Long-Term Potentiation. *Journal of Neuroscience*, 26(45), 11513–11521. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2259-06.2006>
- Joung, H.-Y., Jung, E.-Y., Kim, K., Lee, M.-S., Her, S., & Shim, I. (2012). The differential role of NOS inhibitors on stress-induced anxiety and neuroendocrine alterations in the rat. *Behavioural Brain Research*, 235(2), 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.07.037>
- Kalouda, T., & Pitsikas, N. (2015). The nitric oxide donor molsidomine induces anxiolytic-like behaviour in two different rat models of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 138, 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.09.004>
- Kalueff, A. V., Gebhardt, M., Stewart, A. M., Cachat, J. M., Brimmer, M., Chawla, J. S., Craddock, C., Kyzar, E. J., Roth, A., Landsman, S., Gaikwad, S., Robinson, K., Baatrup, E., Tierney, K., Shamchuk, A., Norton, W., Miller, N., Nicolson, T., Braubach, O., ... Zebrafish Neuroscience Research Consortium. (2013). Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*, 10(1), 70–86. <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0861>
- Kinkel, M. D., Eames, S. C., Philipson, L. H., & Prince, V. E. (2010). Intraperitoneal Injection into Adult Zebrafish. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*, (42), e2126. <https://doi.org/10.3791/2126>
- Kumar, R. (2011). Chapter 12: Selecting a Sample. In *Research methodology: A step-by-step guide for beginners*.

- Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, 269(1), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.077>
- LeDoux, J. (2012). Rethinking the Emotional Brain. *Neuron*, 73(4), 653–676. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.004>
- Lewis, D. M. G., Al-Shawaf, L., Thompson, M. B., & Buss, D. M. (2021). Evolved psychological mechanisms. Em *The SAGE handbook of evolutionary psychology: Foundations of evolutionary psychology* (p. 96–119). Sage Reference. <https://doi.org/10.4135/9781529739442.n6>
- Li, L., Feng, X., Zhou, Z., Zhang, H., Shi, Q., Lei, Z., Shen, P., Yang, Q., Zhao, B., Chen, S., Li, L., Zhang, Y., Wen, P., Lu, Z., Li, X., Xu, F., & Wang, L. (2018). Stress Accelerates Defensive Responses to Looming in Mice and Involves a Locus Coeruleus-Superior Colliculus Projection. *Current Biology*, 28(6), 859-871.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.005>
- Lima, M. G., Silva, R. X. do C., Silva, S. de N. dos S., Rodrigues, L. do S. dos S., Oliveira, K. R. H. M., Batista, E. de J. O., Maximino, C., & Herculano, A. M. (2016). Time-dependent sensitization of stress responses in zebrafish: A putative model for post-traumatic stress disorder. *Behavioural Processes*, 128, 70–82. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2016.04.009>
- Lima, M. G., Silva, S. de N. dos S., Silva, R. X. do C., Oliveira, K. R. H. M., Batista, E. de J. O., Maximino, C., & Herculano, A. M. (2015). Putative involvement of the nitrenergic system on the consolidation, but not initiation, of behavioral sensitization after conspecific alarm substance in zebrafish. *Pharmacology Biochemistry and Behavior, Using Zebrafish Models for Neurobehavioral Pharmacology*, 139, 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.08.005>

- Lima-Maximino, M., Mendes, C. H. M., Araújo, D. B., da Conceição Araújo, F. E., Araújo, do Nascimento Almeida, M., Santos, V. S., Heymbeeck, J. A. A., de Souza, C. L. D., de Souza Lima, P., do Nascimento, W. L., de Souza, L. V. X. B., de Oliveira, L. N., Costa, B. P. D., de Siqueira-Silva, D. H., & Maximino, C. (2025). *Stressor-specific profiles of impacts in anxiety-like behavior and oxidative imbalance in zebrafish* (Zu7fh_v1). PsyArXiv. https://doi.org/10.31234/osf.io/zu7fh_v1
- Lima-Maximino, M., Pyterson, M. P., Do Carmo Silva, R. X., Gomes, G. C. V., Rocha, S. P., Herculano, A. M., Rosemberg, D. B., & Maximino, C. (2020). Phasic and tonic serotonin modulate alarm reactions and post-exposure behavior in zebrafish. *Journal of Neurochemistry*, 153(4), 495–509. <https://doi.org/10.1111/jnc.14978>
- Lisboa, S. F., Magesto, A. C., Aguiar, J. C., Resstel, L. B. M., & Guimarães, F. S. (2013). Complex interaction between anandamide and the nitrenergic system in the dorsolateral periaqueductal gray to modulate anxiety-like behavior in rats. *Neuropharmacology*, 75, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.008>
- López, J. M., Moreno, N., Morona, R., Muñoz, M., & González, A. (2005). Colocalization of nitric oxide synthase and monoamines in neurons of the amphibian brain. *Brain Research Bulletin*, 66(4–6), 555–559. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2005.05.008>
- MacKenzie, G. M., Rose, S., Bland-Ward, P. A., Moore, P. K., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1994). Time course of inhibition of brain nitric oxide synthase by 7-nitro indazole. *Neuroreport*, 5(15), 1993–1996. <https://doi.org/10.1097/00001756-199410000-00039>
- Madrigal, J. L. M., Hurtado, O., Moro, M. A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Castrillo, A., Boscá, L., & Leza, J. C. (2002). The Increase in TNF- α Levels Is Implicated in NF- κ B Activation and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Brain Cortex after

- Immobilization Stress. *Neuropsychopharmacology*, 26(2), 155–163.
[https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00292-5](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00292-5)
- Mariscal, P., Bravo, L., Llorca-Torralba, M., Razquin, J., Miguelez, C., Suárez-Pereira, I., & Berrocoso, E. (2023). Sexual differences in locus coeruleus neurons and related behavior in C57BL/6J mice. *Biology of Sex Differences*, 14(1), 64.
<https://doi.org/10.1186/s13293-023-00550-7>
- Masood, A., Banerjee, B., Vijayan, V. K., & Ray, A. (2003). Modulation of stress-induced neurobehavioral changes by nitric oxide in rats. *European Journal of Pharmacology*, 458(1), 135–139. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02688-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02688-2)
- Mather, M., Clewett, D., Sakaki, M., & Harley, C. W. (2016). Norepinephrine ignites local hotspots of neuronal excitation: How arousal amplifies selectivity in perception and memory. *Behavioral and Brain Sciences*, 39, e200.
<https://doi.org/10.1017/S0140525X15000667>
- Matsushita, H., Takeuchi, Y., Kawata, M., & Sawada, T. (2001). Distribution of NADPH-Diaphorase-Positive Neurons in the Mouse Brain: Differences from Previous Findings in the Rat Brain and Comparison with the Distribution of Serotonergic Neurons. *Acta Histochemica Et Cytochemica - ACTA HISTOCHEM CYTOCHEM*, 34, 235–257.
<https://doi.org/10.1267/ahc.34.235>
- Maximino, C. (2012). *Serotonin and Anxiety: Neuroanatomical, Pharmacological, and Functional Aspects*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4048-2>
- Maximino, C., do Carmo Silva, R. X., dos Santos Campos, K., de Oliveira, J. S., Rocha, S. P., Pyterson, M. P., dos Santos Souza, D. P., Feitosa, L. M., Ikeda, S. R., Pimentel, A. F. N., Ramos, P. N. F., Costa, B. P. D., Herculano, A. M., Rosemberg, D. B., Siqueira-Silva, D. H., & Lima-Maximino, M. (2018). Sensory ecology of ostariophysan alarm substances. *Journal of Fish Biology*, 95(1), 274–286. <https://doi.org/10.1111/jfb.13844>

- Maximino, C., Lima, M. G., Costa, C. C., Guedes, I. M. L., & Herculano, A. M. (2014). Fluoxetine and WAY 100,635 dissociate increases in scototaxis and analgesia induced by conspecific alarm substance in zebrafish (*Danio rerio* Hamilton 1822). *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 124, 425–433. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.07.003>
- Maximino, C., Lima, M. G., Oliveira, K. R. M., Batista, E. de J. O., & Herculano, A. M. (2013). “Limbic associative” and “autonomic” amygdala in teleosts: A review of the evidence. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 48–49, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2012.10.001>
- Maximino, C., Marques de Brito, T., Dias, C. A. G. de M., Gouveia, A., & Morato, S. (2010). Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nature Protocols*, 5(2), 209–216. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.225>
- Maximino, C., Oliveira, J. S. de, & Lima-Maximino, M. G. (2018, agosto 1). *Optimized protocol for quantification of nitrite levels in brain and head kidney tissue samples in adult ze...* <https://www.protocols.io/view/optimized-protocol-for-quantification-of-nitrite-l-sabeaan>
- McNaughton, N., & Corr, P. J. (2004). A two-dimensional neuropsychology of defense: Fear/anxiety and defensive distance. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28(3), 285–305. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2004.03.005>
- Mocelin, R., Marcon, M., D’ambros, S., Mattos, J., Sachett, A., Siebel, A. M., Herrmann, A. P., & Piato, A. (2019). N-Acetylcysteine Reverses Anxiety and Oxidative Damage Induced by Unpredictable Chronic Stress in Zebrafish. *Molecular Neurobiology*, 56(2), 1188–1195. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1165-y>
- Monzón, M. E., Varas, M. M., & De Barioglio, S. R. (2001). Anxiogenesis induced by nitric oxide synthase inhibition and anxiolytic effect of melanin-concentrating hormone

- (MCH) in rat brain. *Peptides*, 22(7), 1043–1047. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(01\)00439-9](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(01)00439-9)
- Moore, F. L., & Lowry, C. A. (1998). Comparative neuroanatomy of vasotocin and vasopressin in amphibians and other vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 119(3), 251–260. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)00014-0](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(98)00014-0)
- Morris, L. S., McCall, J. G., Charney, D. S., & Murrough, J. W. (2020). The role of the locus coeruleus in the generation of pathological anxiety. *Brain and Neuroscience Advances*, 4, 2398212820930321. <https://doi.org/10.1177/2398212820930321>
- Nieuwenhuys, R., Ten Donkelaar, H. J., & Nicholson, C. (1998). *The Central Nervous System of Vertebrates*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-18262-4>
- O’Connell, L. A., & Hofmann, H. A. (2011). The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: A comparative synthesis. *The Journal of Comparative Neurology*, 519(18), 3599–3639. <https://doi.org/10.1002/cne.22735>
- Pavlidis, M., Digka, N., Theodoridi, A., Campo, A., Barsakis, K., Skouradakis, G., Samaras, A., & Tsalafouta, A. (2013). Husbandry of zebrafish, *Danio rerio*, and the cortisol stress response. *Zebrafish*, 10(4), 524–531. <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0819>
- Petersen, S. E., & Sporns, O. (2015). Brain Networks and Cognitive Architectures. *Neuron*, 88(1), 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.027>
- Porter, B. A., & Mueller, T. (2020). The Zebrafish Amygdaloid Complex – Functional Ground Plan, Molecular Delineation, and Everted Topology. *Frontiers in Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00608>
- Quadros, V. A., Silveira, A., Giuliani, G. S., Didonet, F., Silveira, A. S., Nunes, M. E., Silva, T. O., Loro, V. L., & Rosemberg, D. B. (2016). Strain- and context-dependent

- behavioural responses of acute alarm substance exposure in zebrafish. *Behavioural Processes*, 122, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2015.10.014>
- Quock, R. M., & Nguyen, E. (1992). Possible involvement of nitric oxide in chlordiazepoxide-induced anxiolysis in mice. *Life Sciences*, 51(25), PL255-260. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(92\)90119-a](https://doi.org/10.1016/0024-3205(92)90119-a)
- Roxo, M. R., Franceschini, P. R., Zubaran, C., Kleber, F. D., & Sander, J. W. (2011). The limbic system conception and its historical evolution. *TheScientificWorldJournal*, 11, 2428–2441. <https://doi.org/10.1100/2011/157150>
- Ruhl, T., Zeymer, M., & von der Emde, G. (2017). Cannabinoid modulation of zebrafish fear learning and its functional analysis investigated by c-Fos expression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 153, 18–31. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2016.12.005>
- Sachett, A., Gallas-Lopes, M., Conterato, G. M. M., Radharani, Herrmann, A., & Piato, A. (2020, setembro 8). *Quantification of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) optimized for zebrafish brain tissue*. <https://www.protocols.io/view/quantification-of-thiobarbituric-acid-reactive-spe-bjp8kmrw>
- Sachett, A., Gallas-Lopes, M., Radharani, Conterato, G. M. M., Herrmann, A., & Piato, A. (2020, setembro 8). *How to prepare zebrafish brain tissue samples for biochemical assays*. <https://www.protocols.io/view/how-to-prepare-zebrafish-brain-tissue-samples-for-bjkdks6>
- Şahin, E., & Gümüşlü, S. (2004). Alterations in brain antioxidant status, protein oxidation and lipid peroxidation in response to different stress models. *Behavioural Brain Research*, 155(2), 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.04.022>
- Seckler, J. M., Shen, J., Lewis, T. H. J., Abdulameer, M. A., Zaman, K., Palmer, L. A., Bates, J. N., Jenkins, M. W., & Lewis, S. J. (2020). NADPH diaphorase detects S-

- nitrosylated proteins in aldehyde-treated biological tissues. *Scientific Reports*, 10(1), 21088. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78107-6>
- Seeley, W. W. (2019). The Saliency Network: A Neural System for Perceiving and Responding to Homeostatic Demands. *The Journal of Neuroscience*, 39(50), 9878–9882. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1138-17.2019>
- Seeley, W. W., Menon, V., Schatzberg, A. F., Keller, J., Glover, G. H., Kenna, H., Reiss, A. L., & Greicius, M. D. (2007). Dissociable Intrinsic Connectivity Networks for Saliency Processing and Executive Control. *The Journal of Neuroscience*, 27(9), 2349–2356. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5587-06.2007>
- Silva, R. X. do C., do Nascimento, B. G., Gomes, G. C. V., da Silva, N. A. H., Pinheiro, J. S., da Silva Chaves, S. N., Pimentel, A. F. N., Costa, B. P. D., Herculano, A. M., Lima-Maximino, M., & Maximino, C. (2021). 5-HT_{2C} agonists and antagonists block different components of behavioral responses to potential, distal, and proximal threat in zebrafish. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 210, 173276. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2021.173276>
- Silva, R. X. do C., Lima-Maximino, M. G., & Maximino, C. (2018). The aversive brain system of teleosts: Implications for neuroscience and biological psychiatry. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 95, 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.10.001>
- Silva, R. X. do C., Rocha, S. P., Lima-Maximino, M. G., & Maximino, C. (2018, setembro 20). *Extraction of alarm substance in zebrafish*. <https://www.protocols.io/view/extraction-of-alarm-substance-in-zebrafish-tr3em8n>
- Simpson, K. L., Waterhouse, B. D., & Lin, R. C. S. (2003). Differential expression of nitric oxide in serotonergic projection neurons: Neurochemical identification of dorsal raphe

- inputs to rodent trigeminal somatosensory targets. *The Journal of Comparative Neurology*, 466(4), 495–512. <https://doi.org/10.1002/cne.10912>
- Speedie, N., & Gerlai, R. (2008). Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, 188(1), 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.10.031>
- Spolidório, P. C. M., Echeverry, M. B., Iyomasa, M., Guimarães, F. S., & Del Bel, E. A. (2007). Anxiolytic effects induced by inhibition of the nitric oxide-cGMP pathway in the rat dorsal hippocampus. *Psychopharmacology*, 195(2), 183–192. <https://doi.org/10.1007/s00213-007-0890-0>
- Steinert, J. R., Chernova, T., & Forsythe, I. D. (2010). Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 16(4), 435–452. <https://doi.org/10.1177/1073858410366481>
- Uddin, L. Q. (2016). *Salience Network of the Human Brain*. Academic Press.
- Uddin, L. Q., Yeo, B. T. T., & Spreng, R. N. (2019). Towards a Universal Taxonomy of Macro-scale Functional Human Brain Networks. *Brain Topography*, 32(6), 926–942. <https://doi.org/10.1007/s10548-019-00744-6>
- Valentino, R. J., & Van Bockstaele, E. (2008). Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *European Journal of Pharmacology*, 583(2–3), 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.062>
- Vila-Verde, C., Marinho, A. L. Z., Lisboa, S. F., & Guimarães, F. S. (2016). Nitric oxide in the prelimbic medial prefrontal cortex is involved in the anxiogenic-like effect induced by acute restraint stress in rats. *Neuroscience*, 320, 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.040>

- Virgili, M., Poli, A., Beraudi, A., Giuliani, A., & Villani, L. (2001). Regional distribution of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase activities in the central nervous system of teleosts. *Brain Research*, 901(1–2), 202–207. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(01\)02357-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(01)02357-5)
- Volke, V., Kõks, S., Vasar, E., Bourin, M., Bradwejn, J., & Männistö, P. T. (1995). Inhibition of nitric oxide synthase causes anxiolytic-like behaviour in an elevated plus-maze. *Neuroreport*, 6(10), 1413–1416. <https://doi.org/10.1097/00001756-199507100-00013>
- Volke, V., Soosaar, A., Kõks, S., Bourin, M., Männistö, P. T., & Vasar, E. (1997). 7-Nitroindazole, a nitric oxide synthase inhibitor, has anxiolytic-like properties in exploratory models of anxiety. *Psychopharmacology*, 131(4), 399–405. <https://doi.org/10.1007/s002130050309>
- Watts, J., Whitton, P. S., & Pearce, B. (2005). Unexpected Effects of Nitric Oxide Synthase Inhibitors on Extracellular Nitrite Levels in the Hippocampus in vivo. *Pharmacology*, 74(3), 163–168. <https://doi.org/10.1159/000085774>
- Wulsch, T., Chourbaji, S., Fritzen, S., Kittel, S., Grünblatt, E., Gerlach, M., Gutknecht, L., Chizat, F., Gölfler, G., Schmitt, A., Gass, P., Lesch, K.-P., & Reif, A. (2007). Behavioural and expressional phenotyping of nitric oxide synthase-I knockdown animals. In M. Gerlach, J. Deckert, K. Double, & E. Koutsilieri (Eds.), *Neuropsychiatric Disorders An Integrative Approach* (p. 69–85). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-211-73574-9_10
- Young, C. B., Raz, G., Everaerd, D., Beckmann, C. F., Tendolkar, I., Hendler, T., Fernández, G., & Hermans, E. J. (2017). Dynamic Shifts in Large-Scale Brain Network Balance As a Function of Arousal. *Journal of Neuroscience*, 37(2), 281–290. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1759-16.2016>

- Zhang, J., Huang, X.-Y., Ye, M.-L., Luo, C.-X., Wu, H.-Y., Hu, Y., Zhou, Q.-G., Wu, D.-L., Zhu, L.-J., & Zhu, D.-Y. (2010). Neuronal Nitric Oxide Synthase Alteration Accounts for the Role of 5-HT_{1A} Receptor in Modulating Anxiety-Related Behaviors. *Journal of Neuroscience*, 30(7), 2433–2441. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5880-09.2010>
- Zor, T., & Selinger, Z. (1996). Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. *Analytical Biochemistry*, 236(2), 302–308. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0171>