



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

MILENA LETÍCIA MARTINS

ESTRESSORES AGUDOS DISTINTOS PRODUZEM DIFERENTES MAGNITUDES DO
COMPORTAMENTO TIPO DE ANSIEDADE E LIBERAÇÃO DIFERENCIAL DE
GLUTAMATO NO CÉREBRO DE ZEBRAFISH

Belém

2024

MILENA LETÍCIA MARTINS

ESTRESSORES AGUDOS DISTINTOS PRODUZEM DIFERENTES MAGNITUDES DO
COMPORTAMENTO TIPO DE ANSIEDADE E LIBERAÇÃO DIFERENCIAL DE
GLUTAMATO NO CÉREBRO DE ZEBRAFISH

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular, sob orientação do Prof.^o Dr. Anderson Manoel Herculano.

Belém

2024

MILENA LETÍCIA MARTINS

ESTRESSORES AGUDOS DISTINTOS PRODUZEM DIFERENTES MAGNITUDES DO
COMPORTAMENTO TIPO DE ANSIEDADE E LIBERAÇÃO DIFERENCIAL DE
GLUTAMATO NO CÉREBRO DE ZEBRAFISH

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular, sob orientação do Prof.^o Dr. Anderson Manoel Herculano

Belém, PA, 16 de agosto de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^o Dr. Anderson Manoel Herculano (Orientador)

Prof.^a Dr.^a Karen Renata Herculano Matos Oliveira

Prof.^a Dr.^a Luana Ketlen Reis Leão

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de tornar real e concreto esse objetivo, pelo amparo e por sempre guiar meus caminhos.

À minha família, em especial à minha mãe Maria Lúcia e minhas irmãs Laisa e Camila, por todo carinho, auxílio e por não medirem esforços para a realização dos meus sonhos. Aos meus sobrinhos Cauã, Heitor e Nicolas, que movem meu mundo e me fazem ir em busca da melhor versão de mim a cada dia. Aos demais familiares, agradeço pelo suporte de sempre. Obrigada por compreenderem a minha ausência durante todos esses anos e por tanto amor.

Agradeço aos meus amigos da vida, que estão comigo desde sempre, mesmo que em forma de mensagens. A distância não altera em nada a conexão que temos. Obrigada por cada conselho, risada e por me ampararem tantas vezes. Amo vocês!

Ao meu companheiro de vida, Jorge Lucas, a quem sou profundamente grata pelo incentivo, suporte e afeto diários. Aos meus sogros, Madalena de Jesus e Jorge Gomes, e à minha cunhada, Fernanda Kelly, pelo acolhimento e por me fazerem sentir pertencente. Obrigada por redefinirem o significado de família e me mostrarem que ela vai muito além de meras correlações sanguíneas.

Agradeço imensamente ao meu querido orientador Prof. Dr. Anderson Herculano, pela oportunidade em participar do seu grupo de pesquisa, por sempre me instigar cientificamente e por acreditar no meu trabalho.

Aos colegas que a jornada científica me trouxe, em especial Emerson Pinheiro, Geovanna Saito, Caroline Lima, Luana Carvalho, Stella Coelho, Renato Santos de Lima, Wendell Moura e Isabella Barros, agradeço por toda troca, aprendizado e ajuda em experimentos. Vocês iluminam os meus dias!

Ao Laboratório de Neurofarmacologia Experimental (LNE) pelo suporte e estrutura necessária para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, CNPQ e CAPES pelo incentivo acadêmico e financeiro.

À UFPA, pelo ensino de qualidade e excelência, e por ter sido a melhor casa para mim durante todos esses anos.

Obrigada a todos!

*Dedico à minha avó, Maria Mercês
Martins, meu grande e eterno amor
que me aguarda em outras vidas.*

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser, mas graças a Deus não somos o que éramos antes.”

(Martin Luther King)

RESUMO

O transtorno de ansiedade é um dos distúrbios comportamentais mais bem caracterizados em indivíduos submetidos a estresse agudo ou crônico. Porém, poucos estudos demonstraram como diferentes tipos de estressores podem modular as alterações neuroquímicas envolvidas na geração de ansiedade. No presente estudo, levantamos a hipótese de que sujeitos expostos a diferentes estímulos aversivos (mecânica, química e restrição espacial) apresentam intensidade variada de resposta comportamental tipo ansiedade associada a padrões distintos de liberação de GABA e glutamato no cérebro. Para isso, sessenta zebrafish (*Danio rerio*) adultos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: Controle (CTRL), Estresse Agudo de Contenção (EAC), Substância de Alarme Coespecífica (SAC) e Perseguição com Rede (PR). Após a aplicação dos protocolos de estresse, os animais foram transferidos individualmente ao teste de Distribuição Vertical eliciada pela Novidade para análise comportamental. Posteriormente, seus cérebros foram coletados e submetidos ao ensaio de liberação de GABA e Glutamato para quantificação por HPLC. Nossos resultados comportamentais mostraram que todos os estímulos aversivos foram capazes de induzir comportamento tipo ansiedade. Contudo, o impacto do comportamento ansiogênico foi mais proeminente nos grupos PR e SAC quando comparado ao EAC. Este fenômeno ficou evidente em todos os parâmetros comportamentais analisados (tempo no topo, congelamento, velocidade média, velocidade máxima e natação errática). Nossos dados também mostraram que todos os estímulos aversivos induziram diminuição significativa na liberação de GABA quando comparados ao grupo controle. Por outro lado, apenas os animais expostos a PR e SAC apresentaram aumento nos níveis de glutamato extracelular. Diferentes estressores agudos induzem diferentes intensidades de comportamento tipo ansiedade no zebrafish, bem como provocam alterações específicas na liberação glutamatérgica no cérebro. Estes resultados demonstram a complexidade dos transtornos de ansiedade, destacando que tanto as respostas comportamentais quanto as neuroquímicas são altamente dependentes do contexto, apoiando a nossa hipótese inicial.

Palavras-chave: ansiedade, estresse, neuroquímica, zebrafish.

ABSTRACT

Anxiety disorder is one of the most well characterized behavioral disorder in individuals submitted to acute or chronic stress. However, few studies have demonstrated how different types of stressors can modulate the neurochemical alterations involved in generation of anxiety. In the present study, we hypothesize that subjects exposed to different aversive stimuli (mechanical, chemical and spatial restriction) present varied intensity of anxiety-like behavior response associated with distinct pattern of GABA and Glutamate release in the brain. Sixty adult *Danio rerio* animals were randomly divided into four experimental groups: Control (CTRL), Acute Restraint Stress (ARS), Conspecific Alarm Substance (CAS) and Chasing with Net (CN). After applying the stress protocols, the animals were individually transferred to the Novel Tank Diving Test for behavioral analysis. Subsequently, their brains were collected and subjected to GABA and Glutamate release assay for quantification by HPLC. Our behavioral results showed that all aversive stimuli were capable of inducing anxiety-like behavior. However, the impact of anxiogenic behavior was more prominent in the CN and CAS groups when compared to ARS. This phenomenon was evident in all analyzed behavioral parameters (time on top, freezing, mean speed, maximum speed and erratic swimming). Our data also have shown that all aversive stimuli induced significant decrease in GABA release when compared to the control group. On the other side, only animals exposed to CN and CAS presented increase in extracellular glutamate levels. Different acute stressors induce different intensity of Anxiety-like behavior in zebrafish as well as they provoke specific alterations on the GABAergic and Glutamatergic release in the brain. These results demonstrate the complexity of anxiety disorders, highlighting that both behavioral and neurochemical responses are highly context-dependent, supporting our initial hypothesis.

Keywords: anxiety, stress, neurochemistry, zebrafish.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do eixo HPA.....	13
Figura 2: Neurocircuito da ansiedade.....	18
Figura 3: Alvos farmacológicos nas sinapses inibitória e excitatória.....	22
Figura 4: <i>Danio rerio</i> (zebrafish).....	24
Figura 5: Conectividade neural do complexo da amígdala teleóstea.....	25
Figura 6: Esquema representativo dos Procedimentos experimentais.....	30
Figura 7: Efeito dos estressores no tempo gasto no topo e na trajetória dos animais.....	32
Figura 8: Efeito de estímulos aversivos nos parâmetros comportamentais: tempo de congelamento e frequência de natação errática; e locomotores: velocidade média e velocidade máxima.....	33
Figura 9: Níveis extracelulares de GABA e glutamato no cérebro de zebrafish submetido ao EAC, PR e SAC.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
adBNST	Núcleo anterodorsal do BNST
ANOVA	Análise de variância
BHE	Barreira hematoencefálica
BLA	Amígdala basolateral
BNST	Núcleo do leito da estria terminal
BZD	Benzodiazepínico
CeA	Amígdala central
CeL	Subdivisão lateral da amígdala central
CeM	Subdivisão centromedial da amígdala central
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CRH	Hormônio Regulador de Corticotrofina
Dc	Pálio Dorso central
Dd	Pálio dorsal
DI	Pálio Dorso lateral
Dm	Pálio Dorso medial
Dp	Pálio Dorsal posterior
DSM-V	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais-V
DVN	Teste de Distribuição Vertical eliciada pela Novidade
EAC	Estresse Agudo de Contenção
GABA	Ácido gama-aminobutírico
HIP	Hipotálamo
HPA	eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
IL	Divisão infralímbica do mCPF
mGluR	Receptor Metabotrópico de Glutamato
mPFC	Córtex Pré-frontal medial
NMDA	N-metil-D-Aspartato
OvBNST	Núcleo oval do BNST
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPA	o-Phthaldialdehyde
PAG	Substância Cinzenta Periaquedutal
PL	Divisão pré-límbica do mCPF

PR	Perseguição com Rede
SAC	Substância de Alarme Coespecífica
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SSBH	Solução salina balanceada de Hank
TCA	Ácido Tricloroacético
Vc	Subpálio Ventral central
Vd	Subpálio Ventral dorsal
vHPC	Hipocampo ventral
VI	Subpálio lateral
Vp	Subpálio pós-comissural
Vs	Subpálio supracomissural
Vv	Subpálio ventral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 ESTRESSE.....	12
1.2 TRANSTORNO DE ANSIEDADE.....	14
1.2.1 NEUROCIRCUITOS DO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE.....	16
1.2.2 ESTRATÉGIAS FARMACOLÓGICAS PARA O TRATAMENTO DO TRANSTORNO DE ANSIEDADE.....	20
1.3 ZEBRAFISH COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE.....	23
2. OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS E HABITAÇÃO.....	28
3.2 PROTOCOLOS DE ESTRESSES.....	28
3.3 TESTE COMPORTAMENTAL E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	29
3.4 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES E QUANTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	30
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
4 RESULTADOS	32
4.1 EXPOSIÇÃO A ESTRESSORES DISTINTOS INDUZ MAGNITUDES VARIADAS DO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE.....	32
4.2 ALTERAÇÕES NA LIBERAÇÃO DE GABA E GLUTAMATO NO CÉREBRO DO ZEBRAFISH SUBMETIDO AO EAC, PR e SAC.....	34
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÃO	39
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO

1.1 ESTRESSE

O estresse pode ser caracterizado como uma série de alterações fisiológicas que ocorrem após a percepção de uma ameaça, seja ela ambiental ou psicológica, nas quais o organismo tenta restaurar o equilíbrio homeostático (CHROUSOS, 2009; GODOY et al., 2018; JAMES et al., 2023; SCHNEIDERMAN; IRONSON; SIEGEL, 2005). De forma simplificada, o estressor é qualquer fator ambiental ou psicológico que desencadeia a resposta ao estresse. A responsividade ao estresse fisiológico constitui a base dos princípios evolutivos, garantindo um alto valor adaptativo às espécies (MCEWEN; AKIL, 2020; O'CONNOR; THAYER; VEDHARA, 2021). De uma perspectiva evolutiva, a emoção promovida pelo estresse fisiológico modula a memória (JOËLS et al., 2006), facilita a tomada de decisões (STARCKE; BRAND, 2012) e favorece a cognição (SANDI, 2013) para a ação crítica face a incentivos ambientais. Esses processos foram aprimorados à medida que as espécies desenvolveram a capacidade de lidar com tais eventos estressantes (MCEWEN; AKIL, 2020). Contudo, devido a recorrência dos estressores em nosso cotidiano, as mesmas reações que são adaptativas, por vezes críticas para a sobrevivência, podem contribuir para o desenvolvimento e progressão de processos patológicos, como doenças cardiovasculares, câncer e distúrbios neuropsiquiátricos (MCCALL et al., 2015; SEGAN et al., 2022; YARIBEYGI et al., 2017; ZHANG et al., 2019b).

Quando o organismo não consegue se adaptar ao estresse, ele perde a capacidade de manter a homeostase frente aos estressores, comprometendo os ajustes fisiológicos e comportamentais essenciais para uma resposta eficaz ao estresse (CHROUSOS, 2009; SCHNEIDERMAN; IRONSON; SIEGEL, 2005). Assim, dependendo da persistência e intensidade do estímulo estressor, os principais sinais e sintomas podem ser físicos ou psicológicos. Entre os sintomas físicos mais comuns estão o aumento da sudorese, taquicardia, tensão muscular, hiperatividade, náuseas e insônia. Já entre os sintomas psicológicos destacam-se a ansiedade, déficit de atenção, preocupação excessiva, angústia, dificuldades interpessoais, pensamento fixo no estressor e hipersensibilidade emocional (APA, 2023). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o estresse impacta aproximadamente 90% da população global. No entanto, a maneira como as pessoas lidam com o estresse e os sintomas manifestados varia significativamente entre os indivíduos. Essa variabilidade é atribuída a fatores genéticos e socioambientais que

influenciam a resposta individual ao estresse, tornando alguns indivíduos mais vulneráveis do que outros (GILLESPIE et al., 2009).

As respostas autonômicas ao estresse são originadas pela ativação de áreas cerebrais que controlam os órgãos internos. Essas respostas podem ocorrer por meio de duas vias: uma rápida e outra lenta. Na via rápida, o hipotálamo envia sinais neurais pela medula espinhal, ativando o sistema nervoso simpático. Esse processo estimula a medula das glândulas adrenais a liberar adrenalina na circulação, a qual, por sua vez, ativa diferentes tipos de células em glândulas endócrinas e no cérebro (O'CONNOR; THAYER; VEDHARA, 2021). Na via lenta (Figura 1), ocorre a ativação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA). O hipotálamo produz o hormônio liberador de corticotropina (CRH), que age sobre a pituitária anterior, desencadeando a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Este, por sua vez, atua no córtex das glândulas adrenais, estimulando a liberação de cortisol no sistema circulatório, o que também ativa células nas glândulas endócrinas e no cérebro (SAPOLSKY, 2003). Em condições fisiológicas basais, o cortisol exerce autorregulação ao modular negativamente (feedback negativo) o hipotálamo e/ou a pituitária, interrompendo a liberação dos hormônios dão prosseguimento à cascata de estresse (GJERSTAD; LIGHTMAN; SPIGA, 2018; HERMAN et al., 2012).

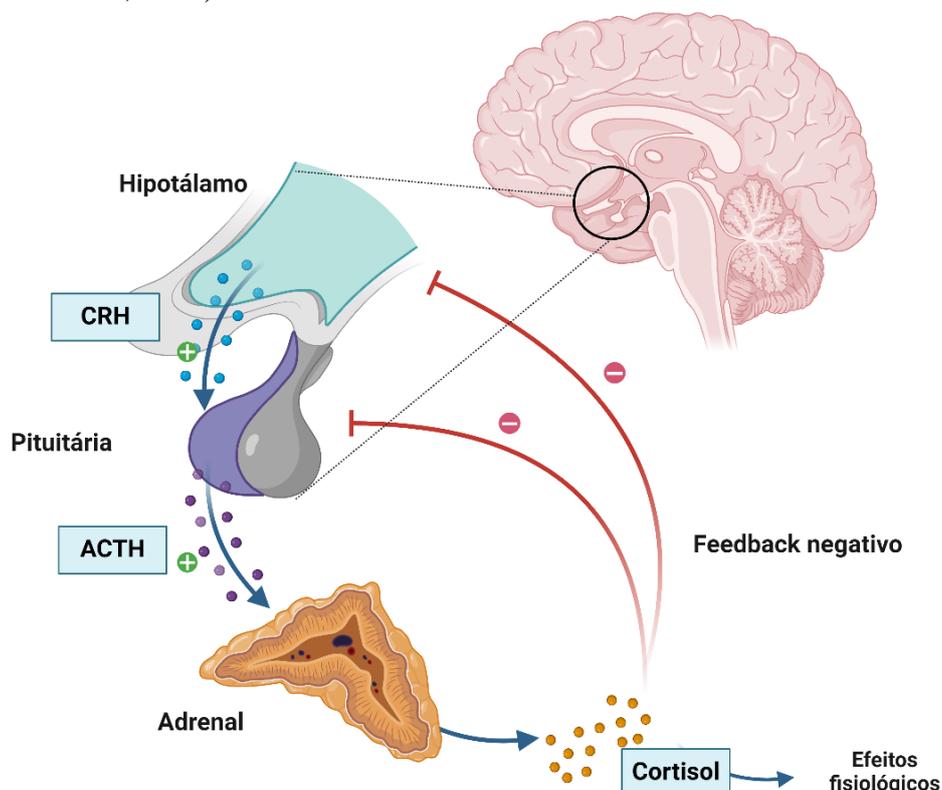


Figura 1: Representação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal. Hipotálamo produz o hormônio regulador de corticotropina (CRH), que estimula a pituitária anterior a liberar o hormônio adrenocorticotrófico

(ACTH). Este hormônio atua sobre o córtex das glândulas adrenais, estimulando a liberação de cortisol. O cortisol controla a sua liberação modulando negativamente o hipotálamo e/ou a pituitária. (Fonte: Autor; criado em BioRender.com; adaptado: Guyton & Hall: Tratado de fisiologia médica, 2017).

A ativação excessiva do eixo HPA eleva cronicamente os níveis de cortisol e induz toxicidade de glicocorticoides em todo o organismo (GADEK-MICHALSKA et al., 2013). A nível de SNC, essas moléculas atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) e interagem com os seus receptores. Com isso, o cortisol pode influenciar a plasticidade neural, afetando a formação de novas sinapses e a remodelação de circuitos neurais, especialmente no sistema límbico, devido a grande quantidade de receptores de corticosteroides presentes nesta região (DOS-SANTOS et al., 2023; CHATTARJI et al., 2015; MCEWEN, 2007; MCEWEN et al., 2015). No sistema límbico, o estresse parece exercer um papel dual. Enquanto no hipocampo a exposição prolongada aos glicocorticoides reduz a complexidade dendrítica (CONRAD, 2006), a excitabilidade neuronal (SOUSA; CERQUEIRA; ALMEIDA, 2008) e o volume (JOËLS et al., 2009; MCEWEN, 2000), resultando em atrofia da área, a amígdala basolateral (BLA) é hipertrofiada, com aumento das projeções dendríticas (LAINE; SHANSKY, 2022; MITRA; SAPOLSKY, 2008; VYAS et al., 2002; ZHANG et al., 2019a).

Nesse contexto, respostas mal-adaptativas ao estresse podem contribuir para disfunções no sistema límbico, associadas ao desenvolvimento de doenças psiquiátricas, como o transtorno de ansiedade (MITRA; SAPOLSKY, 2008; ZHANG et al., 2019a). Além disso, os mediadores do estresse podem diminuir a atividade dos neurônios GABAérgicos, ao mesmo tempo que aumentam a atividade dos neurônios glutamatérgicos, contribuindo para os sintomas de ansiedade (BIGGIO et al., 2007; COOK, 2004; HERMAN et al., 2012; POPOLI et al., 2013). Nesses casos, a ativação da resposta ao estresse é tipicamente mais sustentada e desproporcional à ameaça real, dando origem aos sentimentos crônicos de apreensão, evitação generalizada, dentre outros sintomas associados à patologia que interferem no funcionamento diário do indivíduo.

1.2 TRANSTORNO DE ANSIEDADE

Os transtornos mentais caracterizam-se por uma combinação de distúrbios psicológicos e comportamentais que afetam diretamente os pensamentos, percepções e emoções, podendo impactar diretamente no modo como o indivíduo percebe o mundo e como se relaciona com a sociedade (APA, 2016). Fatores genéticos, ambientais, abuso de

substâncias químicas e o contexto socioeconômico podem aumentar a susceptibilidade do indivíduo ao desenvolvimento de transtornos mentais (PEEDICAYIL, 2023; REISS et al., 2019; NIDA, 2024).

De acordo com a classificação dos transtornos psiquiátricos no Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V), publicado pela Associação Americana de Psiquiatria (2013), atualmente existem cerca de 300 transtornos mentais catalogados, sendo o Transtorno de Ansiedade o mais prevalentes. Estima-se que cerca de 374 milhões de pessoas no mundo sofrem de algum tipo de transtorno de ansiedade, sendo o Brasil o país com maior número de casos: 9,3% de sua população afetada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). Esses dados destacam que a prevalência desses transtornos representa um ônus significativo para a saúde pública, com impactos econômicos e sociais consideráveis.

A ansiedade é inerente à maioria das espécies, sendo um comportamento conservado evolutivamente como mecanismo fisiológico adaptativo essencial para a sobrevivência (CRASKE et al., 2017; ROBINSON et al., 2019; TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015). Ela se caracteriza por respostas comportamentais desproporcionais frente a um perigo potencial, mas não necessariamente real. Quando confrontado com situações potencialmente aversivas, o indivíduo sofre alterações comportamentais devido à ativação de um sistema de vigilância que o prepara para "lutar" ou "fugir" (CRASKE et al., 2017). No entanto, a ansiedade é considerada patológica quando essas respostas comportamentais tornam-se excessivamente desproporcionais por períodos prolongados, interferindo nas relações interpessoais do indivíduo e, conseqüentemente, em sua qualidade de vida (BELZUNG; GRIEBEL, 2001; CRASKE; STEIN, 2016; NORRHOM; RESSLER, 2009). Ainda segundo o DSM-V, o termo "Transtorno de Ansiedade" abrange cerca de 12 estados patológicos diferentes, incluindo Transtorno de Pânico, Transtorno de Ansiedade Generalizada, Transtorno do Estresse Pós-traumático, Fobia Social e fobias específicas.

Com isso, tendo em vista a alta prevalência do transtorno, seu caráter prejudicial e multifacetado, o entendimento amplo e claro dos mecanismos que envolvem a ativação defensiva torna-se importante para o desenvolvimento de intervenções direcionadas e bem sucedidas.

1.2.1 NEUROCIRCUITOS DO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE

Inúmeros estudos vêm sendo conduzidos com o objetivo de esclarecer as alterações neurofisiológicas que ocorrem nos transtornos de ansiedade. Fortes evidências indicam que o transtorno surge da disfunção de neurocircuitos que modulam as respostas emocionais frente a estímulos potencialmente aversivos (CALHOON; TYE, 2015). Nesse sentido, as respostas comportamentais inerentes ao transtorno foram intrinsecamente associadas às regiões cerebrais que compõem o sistema límbico, tais como o hipocampo, hipotálamo, tálamo e, principalmente, a amígdala (ANAND; SHEKHAR, 2003; CANNISTRARO; RAUCH, 2003; FORSTER et al., 2012). Apesar de o sistema límbico estar no cerne do comando dos comportamentos emocionais, outras regiões interconectadas a esta estrutura auxiliam na modulação da resposta comportamental final (CALHOON; TYE, 2015; TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015).

Para elaborar uma resposta apropriada a um estímulo, é necessário primeiramente a detecção do estímulo através dos sistemas sensoriais para, então, interpretá-los como aversivos ou potencialmente aversivos (HERMANS et al., 2014). Conforme ilustrado na figura 2, a detecção é realizada pelo tálamo e córtex sensorial e, uma vez detectado, é realizada a avaliação e interpretação do estímulo. Esta avaliação é realizada por áreas interconectadas, com projeções recíprocas, tais como amígdala basolateral (BLA), amígdala central (CeA), núcleo do leito da estria terminal (BNST), córtex pré-frontal medial (mPFC) e hipocampo ventral (vHPC) (CALHOON; TYE, 2015; TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015). A primeira interpretação é realizada pela BLA que recebe projeções excitatórias sensoriais do tálamo e retransmite através de fibras predominantemente glutamatérgicas para as demais áreas associadas. Por fim, após o processamento, há a ativação das áreas associadas à iniciação do comportamento defensivo e avaliação de risco (ex.: córtex motor, hipotálamo e PAG) (CALHOON; TYE, 2015; TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015).

Devido a essa variedade de tipos e conexões neurais distintas e projeções de longo alcance para outras áreas, estas regiões são capazes de exercer funções potencialmente opostas na ansiedade. Kim *et al.* (2013), utilizando técnicas de direcionamento optogénético, mostraram que sub-regiões do BNST regulam diferencialmente os fenótipos de ansiedade, uma vez que a inibição seletiva do núcleo oval do BNST (ovBNST) demonstrou um efeito ansiolítico, enquanto a inibição dos terminais de fibras da BLA, que têm como alvo o núcleo anterodorsal do BNST (adBNST), exibiu um efeito

ansiosgênico. Outro estudo mostrou que a ativação somática de neurônios excitatórios da BLA induz o comportamento tipo ansiedade, enquanto a ativação seletiva desses neurônios que se projetam para a região lateral da amígdala central (CeL) teve um efeito ansiolítico, possivelmente devido à sua ação inibitória sobre a região centro medial da amígdala central (CeM) (TYE et al., 2011). As projeções glutamatérgicas da BLA para o hipocampo ventral (vHPC) induzem o comportamento tipo ansiedade contextual, enquanto a fotoestimulação direta de células granulares do giro dentado ventral suprime este comportamento (DEGROOT; TREIT, 2004; FELIX-ORTIZ et al., 2013; KHEIRBEK; TANNENHOLZ; HEN, 2012). Além disso, o córtex pré-frontal medial (mPFC) possui subregiões que estão intimamente ligadas à amígdala, onde o córtex infralímbico (IL) inibe a amígdala enquanto o córtex pré-límbico (PL) excita, inibindo e promovendo os comportamentos defensivos, respectivamente (CALHOON; TYE, 2015; DULKA et al., 2020; VIDAL-GONZALEZ et al., 2006). Essas ações distintas dos núcleos amigdaloides e suas interconexões podem ser atribuídas ao tipo e à funcionalidade celular da região, uma vez que as projeções individuais de neurônios de uma mesma região exibem fenótipos diferentes durante o comportamento tipo ansiedade.

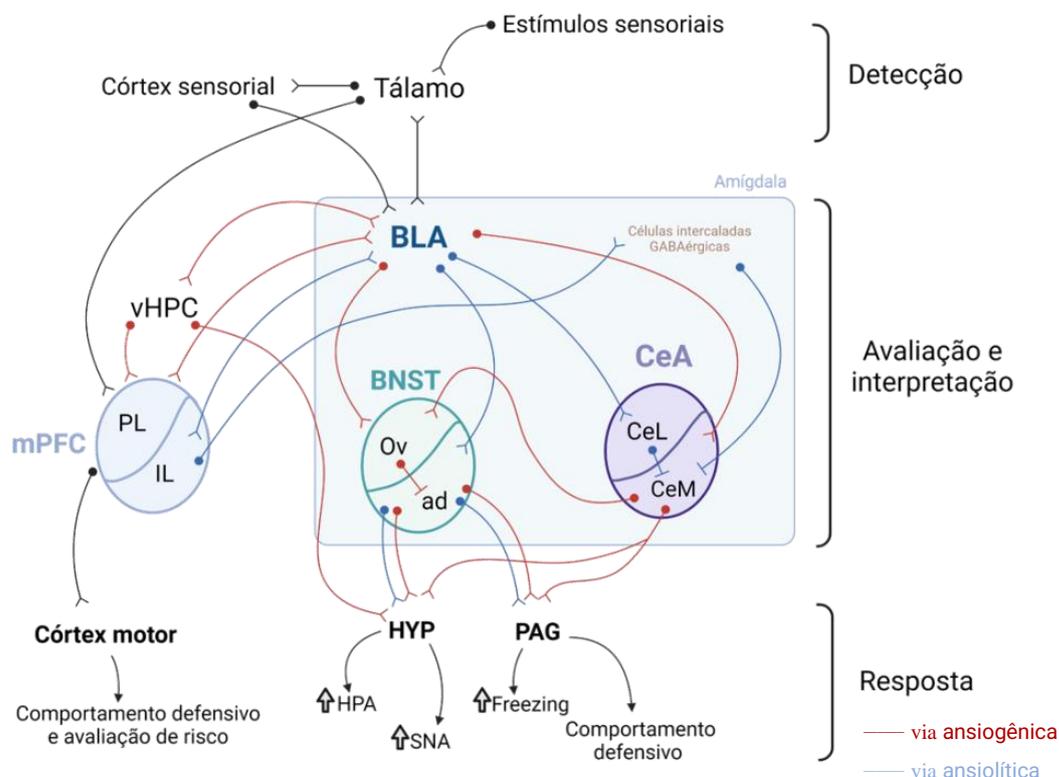


Figura 2: Neurocircuito da ansiedade. A BLA recebe projeções excitatórias do tálamo e córtex sensorial e retransmite os sinais excitatórios para CeA, BNST, vHPC e mPFC. A subdivisão CeM tem caráter

ansio gênico e pode ter suas ações inibidas pela subdivisão CeL e por células GABAérgicas intercaladas. O núcleo anterodorsal do BNST envia projeções inibitórias (ansiolíticas) e excitatórias quando inibido pelo núcleo oval. A divisão IL do mPFC atenua as ações de BLA por meio da ativação das células intercaladas GABAérgicas, enquanto a divisão PL estimula a BLA. BLA, amígdala basolateral; BNST, núcleo do leito da estria terminal; CeA, amígdala central; CeL, subdivisão lateral da amígdala central; CeM, subdivisão centro medial da amígdala; vHPC, hipocampo ventral; HYP, hipotálamo; mPFC, córtex pré-frontal medial; IL, divisão infralímbica do mCPF; PL, divisão pré-límbica do mPFC; Ov, núcleo oval do BNST; ad, núcleo anterodorsal do BNST; PAG, substância cinzenta periaquedutal; (Fonte: Autor; criado em BioRender.com; adaptado: Calhoon, G. G. & Tye, K. M. 2015).

Nesse sentido, diversos neurotransmissores inibitórios e excitatórios estão intimamente envolvidos na modulação do transtorno de ansiedade, com destaque para os sistemas GABAérgicos, serotoninérgico, noradrenérgico e glutamatérgico (MILLAN, 2003; NUSS, 2015; RESSLER; NEMEROFF, 2000; RIAZA BERMUDO-SORIANO et al., 2012). Acredita-se que os mecanismos fisiológicos que mantêm as forças de excitação/inibição exercidas pelos neurotransmissores são perdidos durante o transtorno, onde a diminuição dos estímulos inibitórios aumenta a suscetibilidade do SNC à excitotoxicidade, suscitando os principais sintomas (KALUEFF; NUTT, 2007; NUSS, 2015; WIEROŃSKA et al., 2011). Além disso, a atuação dos neurotransmissores em áreas anatomicamente distintas podem estar atreladas aos diferentes aspectos da resposta à ansiedade.

A presença elevada de interneurônios GABAérgicos na amígdala e suas propriedades inibitórias fornecem fortes evidências de que esse sistema desempenha um papel central na geração do transtorno de ansiedade (ARORA et al., 2024; MILLAN, 2003; NUSS, 2015; WIEROŃSKA et al., 2011). A ação inibitória do GABA sobre o sistema límbico diminui as reações de defesa contra as ameaças. Assim, a diminuição nos níveis de GABA é comumente associada à geração dos sintomas observados durante o transtorno de ansiedade e comportamento tipo-ansiedade (ARORA et al., 2024). A exemplo, pesquisadores observaram que a infusão de GABA ou agonistas do receptor GABAérgico na amígdala reduzia as reações de ansiedade, enquanto a infusão de antagonistas do receptor induzia o comportamento ansio gênico (BARBALHO; NUNES-DE-SOUZA; CANTO-DE-SOUZA, 2009; SANDERS; SHEKHAR, 1995). Ainda, Kash *et al.* (1999) e Heldt *et al.* (2012) demonstraram que camundongos sem GAD, enzima responsável pela conversão de glutamato em GABA, apresentavam um comportamento tipo ansio gênico. Além disso, conforme detalhado na figura 2, os interneurônios

GABAérgicos na amígdala são essenciais no controle da ansiedade, pois inibem as ações potencialmente ansiogênicas do núcleo centro medial da amígdala (CeM) (LI et al., 2011; ROYER; PARÉ, 2002). Alternativamente, projeções inibitórias GABAérgicas controlam o eixo HPA (CULLINAN; ZIEGLER; HERMAN, 2008), sugerindo que a diminuição de GABA contribui para a hiperatividade do eixo, associada aos sintomas de ansiedade. Esses achados reforçam a importância central do sistema GABAérgico na regulação da ansiedade, tornando os seus receptores alvos de medicamentos utilizados para tratar o transtorno.

No entanto, é importante destacar que, apesar do papel central do sistema GABAérgico na ansiedade, esse sistema não é o único envolvido na patologia. Outros neurotransmissores também foram implicados, incluindo o glutamato. Devido à abundância de sinapses glutamatérgicas no sistema límbico (cerca de 80% das sinapses excitatórias), sobretudo na BLA, há evidências significativas sobre o papel da neurotransmissão glutamatérgica na patogênese dos transtornos de ansiedade, sendo associado à excitotoxicidade observada durante o transtorno (BERNADETTE M; K LUAN, 2005; RIAZA BERMUDO-SORIANO et al., 2012; WIEROŃSKA et al., 2011). As regiões límbicas e paralímbicas associadas à ansiedade são abundantemente inervadas por projeções aferentes e eferentes glutamatérgicas (CALHOON; TYE, 2015; MYERS; CARLEZON; DAVIS, 2011; RIAZA BERMUDO-SORIANO et al., 2012). As eferências glutamatérgicas da divisão infralímbica do mPFC projetam-se para as células intercaladas GABAérgicas na amígdala, induzindo um *input* inibitório para a divisão CeM da amígdala (COURTIN et al., 2013; ROYER; PARÉ, 2002). Nesse sentido, Bremmer *et al.* (1999) observaram que pessoas com um dos subtipos do transtorno de ansiedade possuíam uma atividade reduzida do mPFC o que resultou, conseqüentemente, em uma hiperativação da amígdala quando expostos ao fator estressante. Em contraste, outros pesquisadores observaram um aumento no efluxo de glutamato no mPFC e no hipocampo após a exposição ao estímulo estressor (BAGLEY; MOGHADDAM, 1997; MOGHADDAM, 1993). Sugere-se que este evento pode ter sido mediado pela divisão pré-límbica do mPFC, responsável por excitar a BLA para modular as respostas comportamentais associadas ao estresse, enquanto as projeções glutamatérgicas que partem do hipocampo agem diretamente nos centros hipotalâmicos (figura 2). Dessa forma, a redução das saídas excitatórias da amígdala pode ser alcançada pela modulação da transmissão glutamatérgica.

Dada a importância dos sistemas GABAérgico e glutamatérgico na etiologia dos transtornos de ansiedade, a modulação desses sistemas tem se mostrado um pilar fundamental no desenvolvimento de terapias mais eficazes. Através da regulação precisa da neurotransmissão inibitória e excitatória, esses sistemas fornecem uma base sólida para intervenções farmacológicas que visam reequilibrar as dinâmicas neuroquímicas envolvidas na ansiedade.

1.2.2 ESTRATÉGIAS FARMACOLÓGICAS PARA O TRATAMENTO DO TRANSTORNO DE ANSIEDADE

Como discutido anteriormente, alterações no equilíbrio dinâmico entre os mecanismos de excitação e inibição, mediados pelo glutamato e GABA, respectivamente, podem resultar em hiperexcitabilidade do SNC, frequentemente associada aos transtornos de ansiedade. Dessa forma, os sistemas GABAérgico e glutamatérgico desempenham papéis essenciais na regulação da ansiedade, sendo alvos cruciais para intervenções terapêuticas.

Dada a importância do GABA na modulação da excitabilidade dos neurocircuitos, seus receptores emergem como alvos essenciais para o tratamento de transtornos de ansiedade. Por meio da ação sobre os receptores GABAérgicos, é possível restaurar o equilíbrio inibitório no sistema, promovendo efeitos ansiolíticos e estabilizando as respostas emocionais exacerbadas, o que reforça o papel crucial desses receptores na terapêutica da ansiedade. A nível molecular, os receptores ionotrópicos GABA_A são particularmente importantes pois induzem um aumento imediato na condutância do cloreto através da membrana celular, levando à inibição do neurônio e tornando-o menos responsivo a estímulos excitatórios (GHIT et al., 2021), conforme ilustrado na figura 3. Estudos anteriores demonstraram que déficits no receptor GABA_A foram implicados aos transtornos de pânico e ansiedade generalizada em modelos animais (BREMNER et al., 2000; MALIZIA; CUNNINGHAM; BELL, 1998). Dada a importância, os transtornos de ansiedade têm sido tratados com benzodiazepínicos (BZD), que atuam ligando-se ao sítio alostérico do receptor GABA_A para exercerem seus efeitos ansiolíticos (GHIT et al., 2021; NUTT; MALIZIA, 2001). Apesar de serem amplamente prescritos, esses medicamentos têm sido associados a diversos efeitos indesejados, como disfunções cognitivas, sedação, dependência e síndrome de abstinência (BALDWIN et al., 2013)

Como os benzodiazepínicos exercem seus efeitos ansiolíticos através do aumento da transmissão inibitória mediada pelo GABA, uma estratégia alternativa para alcançar o mesmo resultado seria a redução da neurotransmissão excitatória glutamatérgica. Nesse contexto, o bloqueio da excitação neuronal mediada pelos receptores de glutamato tem se destacado como um alvo promissor para o desenvolvimento de novas drogas com potencial ansiolítico. Ao reduzir a atividade excessiva dos receptores glutamatérgicos, essas abordagens visam restaurar o equilíbrio entre os sistemas inibitório e excitatório, oferecendo uma alternativa eficaz para o tratamento dos transtornos de ansiedade (WIEROŃSKA et al., 2011). Assim, dada a abundância de receptores glutamatérgico no sistema límbico, uma série de compostos que agem como antagonistas competitivos dos receptores de glutamato foram descritos, dentre eles o 2-metil-6-(feniletinil)-piridina (MPEP) que age seletivamente sobre a classe de receptores metabotrópicos mGlu5 (VARNEY et al., 1999; GASPARINI et al., 1999) e antagonistas dos receptores ionotrópicos NMDA (MK-801 e CPG), sendo capazes de reduzir o comportamento tipo ansiedade em modelos animais (BERGINK; VAN MEGEN; WESTENBERG, 2004; RIAZA BERMUDO-SORIANO et al., 2012; WANG et al., 2022) (figura 3).

Estudos anteriores demonstraram que animais geneticamente modificados, sem a subunidade NR1 do receptor NMDA, são menos propensos a desenvolverem fenótipos comportamentais de ansiedade (BARKUS et al., 2010; NIEWOEHNER et al., 2007). Enquanto administrações intraperitoneais (ip) ou orais de MPEP foram capazes de aumentar o tempo de permanência e comportamento exploratório dos animais nos braços abertos do teste de Labirinto em Cruz Elevado, além de aumentarem o número de choques aceitos em um teste de conflito (PALUCHA et al., 2001; SPOOREN et al., 2000; TATARCZYŃSKA et al., 2001). Assim, a modulação dos receptores glutamatérgicos, seja por inibição direta ou por influências indiretas, também emerge como uma estratégia promissora no tratamento de ansiedade, especialmente em casos em que as terapias tradicionais são insuficientes. Por isso, o conhecimento acerca da sinalização glutamatérgica, em particular dos seus receptores, ajuda a elucidar mecanismos subjacentes aos transtornos de ansiedade.

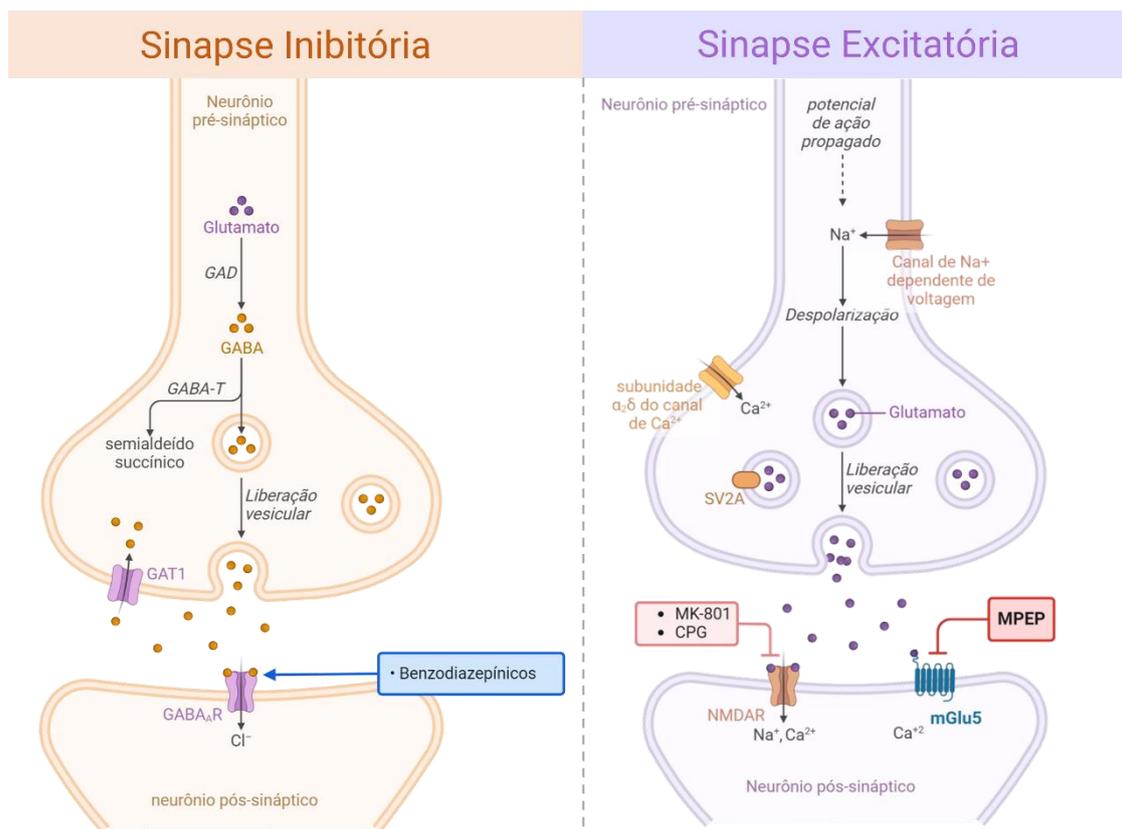


Figura 3: Alvos farmacológicos nas sinapses inibitória e excitatória. Os benzodiazepínicos atuam em um sítio alostérico dos receptores GABA_A, induzindo um influxo de cloreto (Cl⁻), o que torna o neurônio menos suscetível a estímulos excitatórios. O MK-801 e o CPG antagonizam receptores ionotrópicos de glutamato, enquanto o MPEP antagoniza a subclasse de receptores metabotrópicos mGlu5, inibindo a condutância de correntes excitatórias (Fonte: Autor; criado em BioRender.com; adaptado: Golan, D. E. *et al.* Princípios de Farmacologia. 3ª edição, 2014).

Como resultado, estratégias terapêuticas direcionadas a esses sistemas não apenas ajudam a controlar os sintomas, mas também contribuem para uma compreensão mais profunda dos mecanismos subjacentes ao transtorno de ansiedade, abrindo caminho para tratamentos inovadores e personalizados, reforçando a importância de estratégias terapêuticas que considerem a complexidade neuroquímica envolvida na regulação emocional.

Devido à complexidade do transtorno, os mecanismos neurobiológicos pelos quais os estressores modulam os diferentes fenótipos comportamentais e alterações neuroquímicas não estão bem descritos. Responder estCom isso, uma abordagem para uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes à resposta ao estresse e à ansiedade é a utilização de modelos animais que forneçam respostas comportamentais robustas e bem definidas.

1.3 ZEBRAFISH COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE

O zebrafish (*Danio rerio*), também conhecido como paulistinha, é um teleósteo de água doce, natural do sul asiático (figura 4). Este animal foi introduzido na pesquisa científica como modelo experimental nas décadas de 1970 e 1980, pelo biólogo George Straisinger. Devido a sua versatilidade como modelo, atualmente o zebrafish é largamente utilizado em estudos farmacológicos (ASSAD et al., 2020; BARROS et al., 2008; KHAN et al., 2017; LUCAS LUZ et al., 2021), genéticos (GRUNWALD; EISEN, 2002; STEWART et al., 2015), toxicológicos (LANTZ-MCPEAK et al., 2016; STEWART et al., 2014) e comportamentais, sobretudo em modelos de ansiedade (ASSAD et al., 2020; EGAN et al., 2010; KALUEFF et al., 2013, 2014; STEWART et al., 2012).

Como modelo biológico, o zebrafish oferece inúmeras vantagens para os pesquisadores. Entre essas vantagens estão seu fácil armazenamento e baixo investimento para manutenção em laboratório. Além disso, sua rápida reprodução extrauterina e a elevada quantidade de ovos com embriões transparentes permitem análises detalhadas e manipulações em diversos estágios do desenvolvimento. O zebrafish também possui um sistema endócrino que fornece respostas robustas ao estresse e características comportamentais bem definidas (ALSOP; VIJAYAN, 2009, 2008; GRIFFITHS et al., 2012; PAVLIDIS; THEODORIDI; TSALAFOUTA, 2015). Alguns fatores fisiológicos favorecem o alto desempenho do zebrafish em estudos comportamentais e neuroquímicos. Entre esses fatores, destaca-se a presença de sistemas clássicos de neurotransmissores de vertebrados, como glutamatérgico, GABAérgico, serotoninérgico, purinérgico, catecolaminérgico, colinérgico, entre outros (MAXIMINO; HERCULANO, 2010; PANULA et al., 2006; RICO et al., 2011; STEWART et al., 2013; TURRINI et al., 2023). Além disso, o sistema organizacional do SNC do zebrafish é bem conservado evolutivamente (MAXIMINO; HERCULANO, 2010).

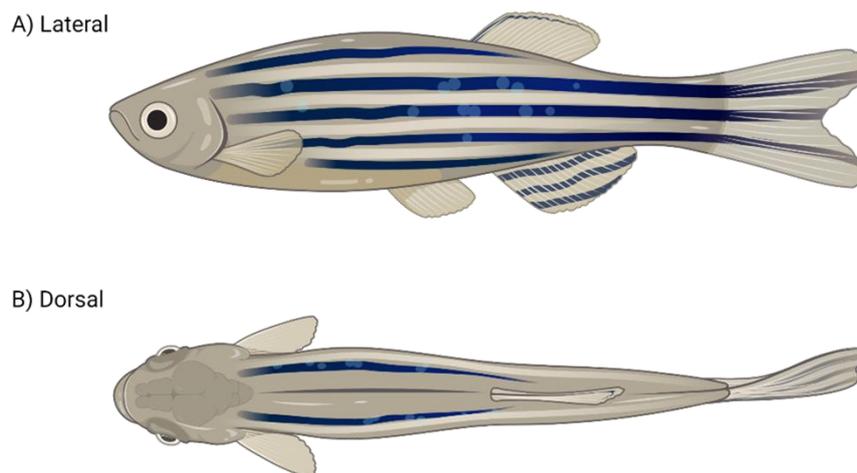


Figura 4: *Danio rerio* (zebrafish), linhagem Short-finn. Vista lateral (A) e dorsal (B). (Fonte: Autor; criado em BioRender.com).

Como citado anteriormente, em mamíferos, os comportamentos emocionais como a sociabilidade, resposta ao medo e ansiedade são mediados pelo sistema límbico, sobretudo pela amígdala (TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015). Estudos indicam que, no zebrafish, as regiões cerebrais homólogas ao sistema límbico de mamíferos são representadas pelo telencéfalo (LAL; KAWAKAMI, 2022). O telencéfalo teleósteo possui duas subdivisões principais: o telencéfalo dorsal (pálio) e o telencéfalo ventral (subpálio). Ambas as regiões são constituídas por subnúcleos especializados em conexões neurais distintas. Conforme ilustrado na figura 5, no telencéfalo dorsal estão presentes os subnúcleos: Dorso medial (Dm) correspondente a amígdala basolateral (BLA) mamífera; Pálio dorsal (Dd) associado ao isocortex de mamífero; Dorso lateral (Dl), homólogo ao hipocampo de mamífero; Dorso central (Dc); Dorsal posterior (Dp). Já o telencéfalo ventral é constituído pelos subnúcleos: Subpálio ventral (Vv); Ventral dorsal (Vd), Ventral central (Vc) e Subpálio lateral (Vl); Núcleo supracomissural (Vs), associada à amígdala central (CeA) dos mamíferos; Núcleo pós-comissural (Vp) (LAL; KAWAKAMI, 2022; MUELLER et al., 2011; PORTER; MUELLER, 2020). Dadas as semelhanças com o SNC de mamíferos, o zebrafish se revela um modelo adequado para pesquisas translacionais de transtornos mentais humanos.

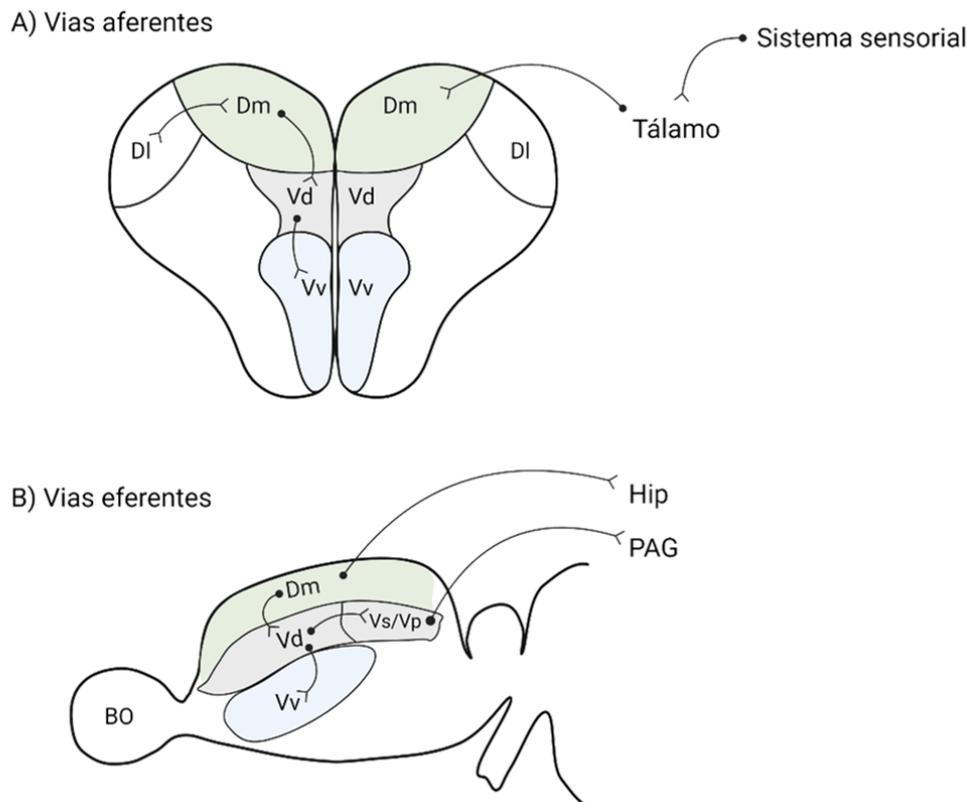


Figura 5: Conectividade neural do complexo da amígdala teleostea. Dm recebe informações sensoriais (somatosensorial, visual, auditiva, linha lateral, gustativa e odor) através do tálamo. Dm projeta-se para o núcleo dorsal (Vd), núcleo supracomissural (Vs) e núcleo pós-comissural (Vp) do telencéfalo ventral. Esses núcleos possuem projeções eferentes para vários núcleos hipotalâmicos (Hip) e para a substância cinzenta periaquedutal (PAG). BO, bulbo olfatório. (Fonte: Autor, criado em BioRender.com; adaptado: Lal, P. & Kawakami, K., 2022).

Para reproduzir um modelo de ansiedade em zebrafish, os pesquisadores utilizam diversos métodos de exposição do animal a estímulos aversivos. Em 2011, Piato *et al.* desenvolveram um protocolo de estresse baseado na restrição espacial do animal (Estresse Agudo de Contenção), observando ao final alterações comportamentais características do comportamento tipo ansiedade, semelhante às observadas em outros vertebrados sob o estresse. Outro estressor comumente utilizado é a exposição à substância de alarme. Em 1941, Karl von Frisch constatou que esta substância é produzida nas células epidérmicas dos peixes e liberada após um dano causado por um predador, resultando em uma resposta do tipo panicogênica e de ansiedade em coespecíficos próximos. Para induzir estresse por métodos físicos, a perseguição com rede é comumente utilizada (DE ABREU *et al.*, 2014). Esse método provoca a liberação de hormônios do estresse, como o cortisol, além de ativar o sistema nervoso simpático, resultando em uma

resposta de fuga e alterações comportamentais. Dependendo da intensidade do estímulo, o estresse pode se manifestar de forma sustentada, induzindo respostas semelhantes às observadas em comportamentos tipo ansiedade. Isso torna a perseguição com rede um método eficaz para estudar as respostas ao estresse e à ansiedade, bem como seus mecanismos subjacentes.

Para validar a indução do modelo de ansiedade, alguns parâmetros podem ser analisados como os níveis de neurotransmissores associados ao transtorno no SNC (CANAVELLO et al., 2011; LUZ et al., 2021). Além disso, para avaliar o comportamento tipo ansiedade, os pesquisadores recorrem a testes comportamentais amplamente reconhecidos. Esses testes exploram comportamentos inatos dos animais, que, ao serem expostos a ambientes novos, tendem a buscar refúgio nas áreas mais escuras ou no fundo do aparato, instintivamente evitando potenciais ameaças. Ao mesmo tempo, os animais possuem um forte impulso exploratório inato, o que os leva a investigar novas situações do ambiente novo. O teste se baseia, portanto, no dilema entre a necessidade de explorar o ambiente e o receio dos perigos associados ao desconhecido. Animais com comportamento tipo ansiedade geralmente exibem uma redução significativa em seus comportamentos inatos de exploração, evitando aventurar-se em ambientes novos por não se sentirem seguros. Em geral, um comportamento tipo ansioso é caracterizado por um aumento nos mecanismos de fuga e defesa apresentados pelos animais, como menor tempo de exposição na superfície do aparato, maior latência para o topo, evitação de áreas claras, aumento na frequência movimentos erráticos durante o nado e maior tempo de congelamento (KALUEFF et al., 2013).

Em geral, essas informações respaldam a eficácia do zebrafish como modelo para o estudo translacional do transtorno de ansiedade.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as alterações neuroquímicas no comportamento tipo ansiedade induzido por diferentes estímulos estressores em zebrafish.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar a resposta comportamental após exposição ao Estresse Agudo de Contenção, Perseguição com Rede e Substância de Alarme Coespecífica;
- ✓ Quantificar os níveis extracelulares de GABA e Glutamato após a exposição aos estressores;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS E HABITAÇÃO

Foram utilizados 60 peixes adultos da espécie *Danio rerio* (zebrafish), da linhagem *short-fin*, de ambos os sexos, adquiridos de um fornecedor local (Belém, PA). Os animais foram devidamente aclimatados em tanques de 50L (50cm x 35cm x 30cm), com densidade de 1 animal por litro, à temperatura de $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH} = 7$, em um ciclo de claro/escuro (14h/10h), sendo alimentados duas vezes ao dia. Os animais foram divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais: Controle (n=15), EAC (n=15), SAC (n=15) e PR (n=15). Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais Experimentais da Universidade Federal do Pará (CEPAE—UFPA: 213–14).

3.2 PROTOCOLOS DE ESTRESSES

A indução do estresse foi realizada utilizando três estressores de diferentes naturezas (restrição espacial, mecânica e química).

3.2.1 ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO (EAC)

O estresse baseado na restrição espacial foi realizado utilizando o protocolo de Estresse Agudo de Contenção (EAC), realizado conforme descrito anteriormente por Piatto *et al.* (2011) e Assad *et al.* (2020), que consiste em condicionar o animal em um microtubo plástico (2ml), com pequenas aberturas nas extremidades, permitindo a passagem de água, para restringir sua locomoção durante 90 minutos em um aquário.

3.2.2 PERSEGUIÇÃO COM REDE (PR)

O estresse mecânico descrito por Abreu *et al.* (2014) é denominado Perseguição com Rede (PR). Neste método, os animais são realocados individualmente para um tanque onde são submetidos a movimentos circulares de perseguição com rede, sem captura, durante 2 minutos.

3.2.3 EXPOSIÇÃO À SUBSTÂNCIA DE ALARME COESPECÍFICA (SAC)

Para induzir o estresse químico, foi realizada exposição à Substância de Alarme Conespecífica (SAC), conforme descrito por SILVA *et al.*, 2018. Este protocolo envolve a extração da substância de alarme de um peixe doador. Inicialmente este peixe doador foi crioanestesiado e decapitado utilizando um bisturi. Seu corpo foi então colocado em uma placa de petri, onde foram realizados 15 cortes superficiais em cada lado do tronco, a fim de lesionar as células epiteliais sem causar o extravasamento do conteúdo sanguíneo. Em seguida, o corpo foi transferido para outra placa de Petri e os cortes foram cuidadosamente lavados com 10 ml de água destilada para remover impurezas, como escamas, preservando 7ml como uma unidade de SAC. Esta solução foi então armazenada na geladeira, podendo ser mantida por até 4 horas após a extração. Para exposição ao estresse químico, os animais foram individualmente transferidos para um tanque, onde a SAC foi adicionada à água, permanecendo expostos a ela por 6 minutos.

3.3 TESTE COMPORTAMENTAL E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Após a aplicação dos protocolos de estresse, em seus respectivos grupos, os animais foram transferidos (individualmente) para o aparato do teste de Distribuição Vertical Eliciada pela Novidade (DVN) (LEVIN; BENCAN; CERUTTI, 2007). Este aparato consiste em um tanque (30 cm de comprimento x 22 cm de altura x 15 cm de largura) completamente preenchido com água. O aparato foi subdividido virtualmente em duas áreas: topo e fundo. Cada animal pôde explorar o aparato durante 10 minutos, enquanto suas atividades eram registradas por uma câmera. Nesse período foram avaliados os seguintes parâmetros: 1. Tempo no Topo (s): período que o animal passou explorando a parte superior do aparato; 2. Tempo de congelamento (*freezing*): observado quando o animal está completamente imóvel ($\geq 5s$); 3. Frequência de natação errática (f): caracterizada por mudanças rápidas e imprevisíveis na direção do nado; 4. Velocidade média (cm/s): velocidade média de movimentação do animal durante a observação; 5. Velocidade Máxima (cm/s): maior velocidade alcançada pelo animal durante o período de tempo analisado (KALUEFF *et al.*, 2013). A análise de vídeo do comportamento foi realizada utilizando o Software ZebTrack (PINHEIRO-DA-SILVA *et al.*, 2017), exceto a análise de natação errática que foi realizada manualmente. Os testes comportamentais foram realizados entre 08h00 e 13h00. Após avaliação comportamental, os animais foram

eutanasiados e seus cérebros dissecados para posteriores ensaios bioquímicos em CLAE (Figura 6).

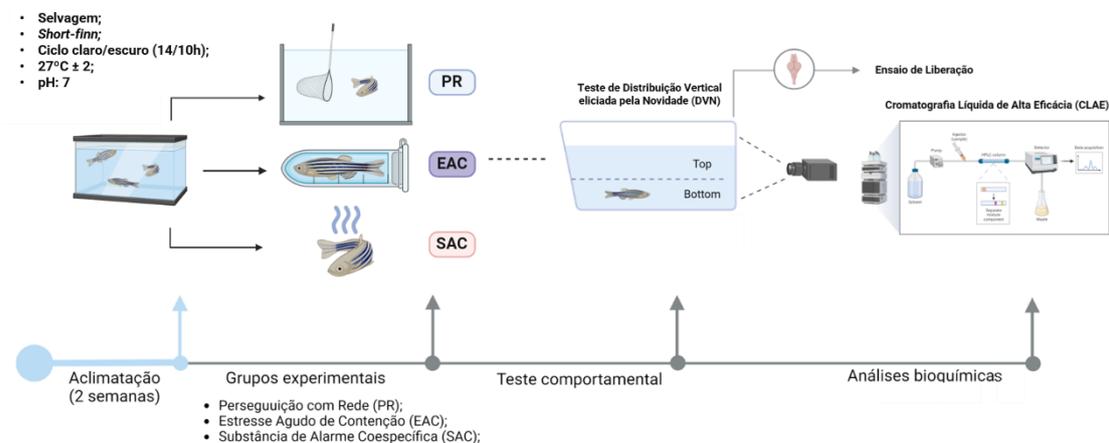


Figura 6: Esquema representativo dos Procedimentos experimentais. Aclimação, exposição aos estressores, teste comportamental e coleta do encéfalo para ensaios bioquímicos por CLAE. (Fonte: Autor; criado em BioRender.com).

3.4 ENSAIO DE LIBERAÇÃO DE NEUROTRANSMISSORES E QUANTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Após avaliação comportamental os animais foram eutanasiados e o encéfalo dissecado e submetidos ao ensaio de Liberação de Glutamato e GABA, conforme descrito anteriormente por Moraes *et al.* (2012). Em uma placa de cultura, as amostras foram lavadas três vezes com solução salina balanceada de Hank (SSBH) consistindo em (mM): NaCl 128, KCl 4, MgCl₂ 2, CaCl₂, glicose 12 e HEPES 20, pH 7,2-7,4 ajustado com NaOH 1N e depois incubadas com 300µL de SSBH a 37°C em estufa de CO₂ por 20 minutos. Posteriormente, os sobrenadantes foram coletados e processados para quantificação de neurotransmissores por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O sistema CLAE (Shimadzu LC-10 AD) é composto por um sistema de injeção acoplado a uma bomba (LC-20 AT), uma coluna analítica C18, um detector de fluorescência (RF-10A_{XL}), além de um comunicador (CBM-20A) e um sistema de aquisição de dados (LC-Solution). A fase móvel (A) utilizada foi composta por 95% de tampão acetato de sódio 50mM pH=5.67, 5% de metanol e 2-propanol, enquanto a Fase estacionária (B) foi composta por metanol 70%.

Para a preparação das amostras, foram adicionados a elas 20µL de TCA (Ácido Tricloroacético) 1% e, então, centrifugadas durante 10 minutos a 5.000rpm. A solução derivatizante é composta por 60µL da amostra, 40µL de Tampão Borato (pH: 9,5) e 10µL

de OPA (o-Phthaldialdehyde). Após 5 minutos de reação, este conteúdo é vortexado e cerca de 20 μ L são injetados no sistema com o auxílio de uma seringa Hamilton. O tempo de corrida é de 25 minutos, sendo o 9^o e 19^o os tempos de retenção de glutamato e GABA, respectivamente. A Homoserina foi utilizada como padrão interno. Os valores de quantificação da liberação de GABA e Glutamato foram expressos em porcentagem do controle e, para a correção dos dados, a dosagem de proteínas foi realizada utilizando o método de Bradford (1976).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média e erro padrão médio (EPM) para análise comportamental e porcentagem do controle para análise bioquímica. A distribuição normal dos dados foi determinada pelo teste de Shapiro-Wilk. A análise de variância (ANOVA) *one-way* seguida do teste *post hoc* de Tukey foi aplicada para avaliar os dados bioquímicos e comportamentais. Todas as análises foram realizadas no *software* GraphPad Prism versão 9.3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), com nível de significância de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 EXPOSIÇÃO A ESTRESSORES DISTINTOS INDUZ MAGNITUDES VARIADAS DO COMPORTAMENTO TIPO ANSIEDADE

Os resultados do teste de Distribuição Vertical eliciada pela Novidade demonstraram que todos os estímulos aversivos induziram diferentes fenótipos de comportamento tipo ansiedade no zebrafish. Observamos uma redução significativa no tempo gasto no topo do tanque nos grupos expostos aos estímulos em comparação ao grupo CTRL ($F_{(3, 37)} = 161,1$; CTRL = $112,1 \pm 6,911$ vs. EAC = $37,09 \pm 4,486$; PR = $4,286 \pm 0,803$ e SAC = $1,821 \pm 0,514$, $p < 0,0001$; Figura 7B). Nossos resultados mostraram que essa redução no tempo no topo foi mais pronunciada nos grupos SAC e PR em comparação ao EAC ($F_{(3, 37)} = 161,1$; EAC = $37,09 \pm 4,486$; PR = $4,286 \pm 0,803$ e SAC = $1,821 \pm 0,514$, $p < 0,0001$; Figura 7B). Na figura 7A, mostramos esses diferentes padrões de comportamento exploratório no tanque dos grupos CTRL, EAC, PR e SAC.

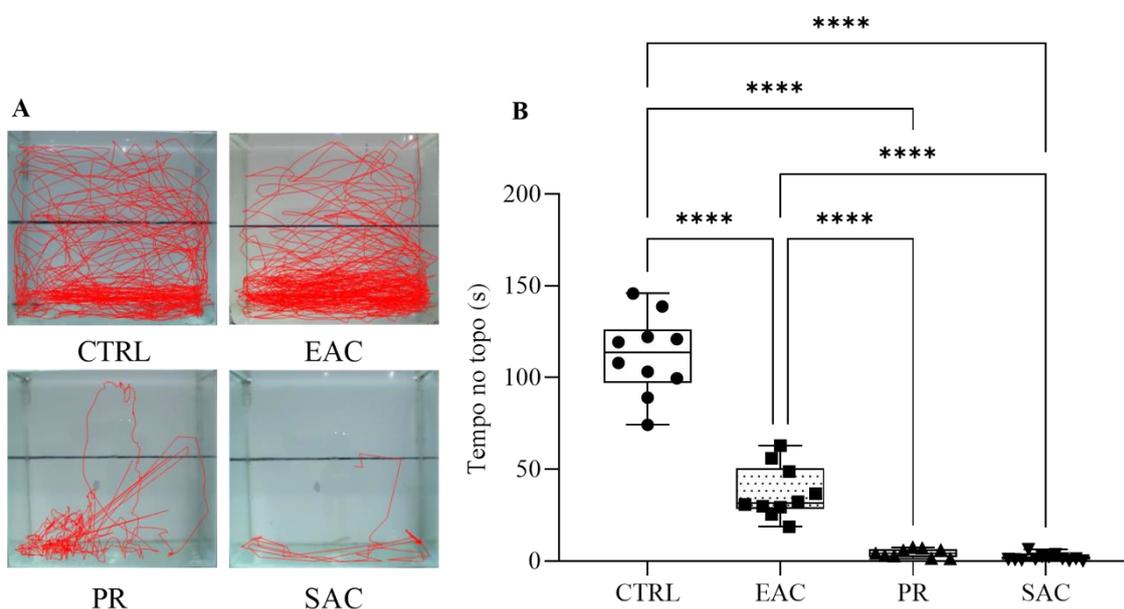


Figura 7: Efeito dos estressores na trajetória dos animais (A) e no tempo gasto no topo (B). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Os dados foram comparados utilizando ANOVA *one-way* seguida de teste *post hoc* de Tukey. **** $p < 0,00001$, *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

Além disso, observamos que a exposição aos protocolos PR e SAC diminuiu significativamente os índices médios de velocidade em comparação aos grupos CTRL e EAC ($F_{(3, 41)} = 60,82$; CTRL = $6,067 \pm 0,282$ e EAC = $5,848 \pm 0,287$ vs. PR = $2,943 \pm 0,334$ e SAC = $1,351 \pm 0,252$; figura 8B). Esses dados justificam o aumento do tempo de congelamento observado nos grupos PR e SAC em comparação aos grupos CTRL e EAC ($F_{(3, 36)} = 127,8$; CTRL = $26,9 \pm 4,199$ e EAC = $63,21 \pm 14,20$ vs. PR = $404,6 \pm 32,04$ e SAC = $509,8 \pm 29,44$; figura 8A).

Com base no parâmetro de natação errática, o comportamento ansiogênico novamente foi mais pronunciado nos grupos PR e SAC em comparação aos grupos CTRL e EAC ($F_{(3, 33)} = 57,49$; CTRL = $2,889 \pm 0,484$ e EAC = $7,25 \pm 0,453$ vs. PR = $10,00 \pm 0,577$ e SAC = $13,40 \pm 0,733$, $p < 0,0001$; Figura 8C). Este parâmetro possivelmente influenciou os índices de velocidade máxima dos grupos PR e SAC em comparação aos grupos CTRL e EAC ($F_{(3, 39)} = 33,53$; CTRL = $53,69 \pm 2,864$ e EAC = $50,61 \pm 3,302$ vs. PR = $113,3 \pm 8,350$ e SAC = $110,9 \pm 8,943$; figura 8D).

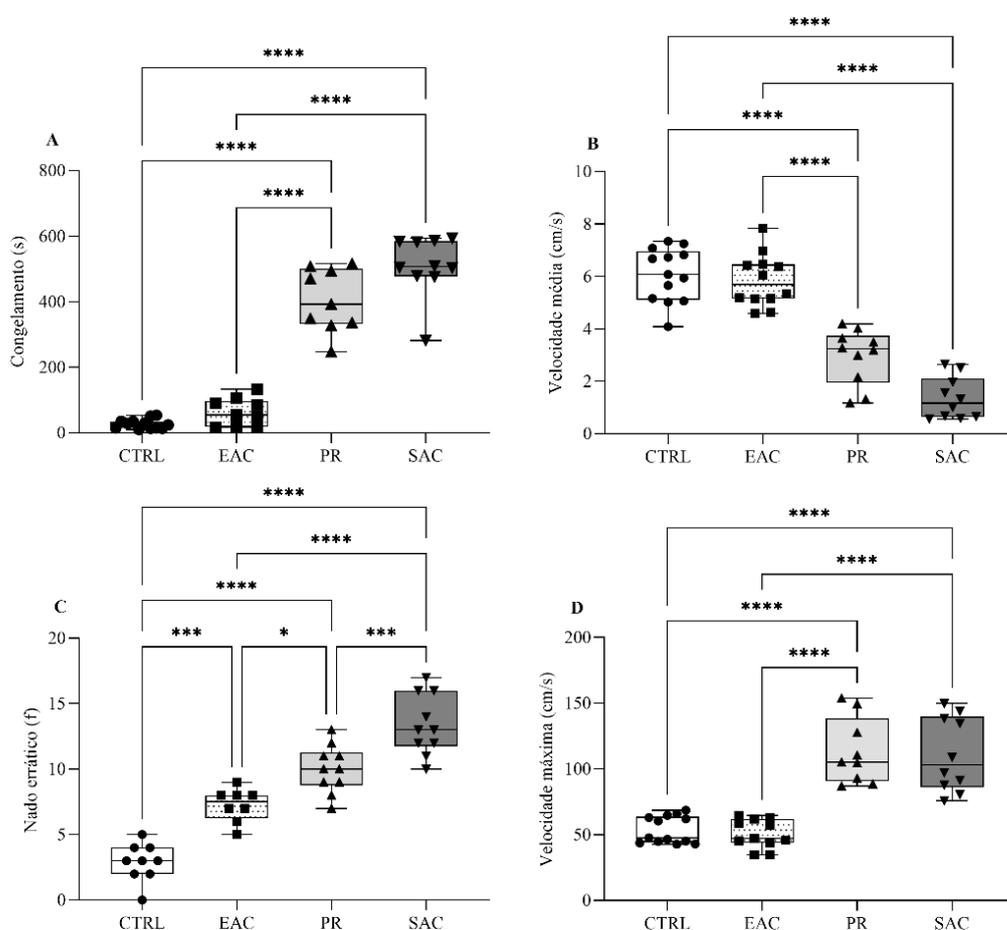


Figura 8: Efeito de estímulos aversivos nos parâmetros comportamentais: tempo de congelamento (A) e frequência de natação errática (C); e locomotores: velocidade média (B) e velocidade máxima (D). Os

resultados foram expressos como média \pm EPM. Os dados foram comparados utilizando ANOVA *one-way* seguida de teste *post hoc* de Tukey. **** $p < 0,00001$, *** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

4.2 ALTERAÇÕES NA LIBERAÇÃO DE GABA E GLUTAMATO NO CÉREBRO DO ZEBRAFISH SUBMETIDO AO EAC, PR e SAC

Nossos resultados demonstraram que diferentes estímulos provocam respostas comportamentais distintas dentro do espectro do comportamento semelhante à ansiedade. Portanto, investigamos se essas diferenças são influenciadas por alterações nos níveis dos neurotransmissores GABA e Glutamato, ambos moduladores na fisiopatologia desse distúrbio. Observamos que todos os estímulos aversivos reduziram a liberação de GABA em aproximadamente 70% em comparação ao grupo CTRL ($F_{(3, 38)} = 52,50$; CTRL = $100,0 \pm 6,126$ vs. EAC = $27,38 \pm 2,827$; PR = $34,78 \pm 4,603$ e SAC = $31,85 \pm 4,098$; $p < 0,0001$; figura 9A). Além disso, nossos resultados mostraram que os animais expostos ao EAC não apresentaram alterações nos níveis de glutamato em comparação ao grupo CTRL. Em contrapartida, os grupos PR e SAC apresentaram um aumento de aproximadamente 74% e 68% na liberação de glutamato em comparação aos grupos CTRL e EAC, respectivamente ($F_{(3, 39)} = 8,469$; CTRL = $100,0 \pm 9,449$ vs PR = $173,7 \pm 12,58$ e SAC = $167,9 \pm 18,54$; $p = 0,0002$; Figura 9B). Estas descobertas sugerem que as diferentes respostas comportamentais observadas após a exposição a estímulos aversivos podem estar correlacionadas com alterações específicas nos níveis de glutamato no cérebro destes animais.

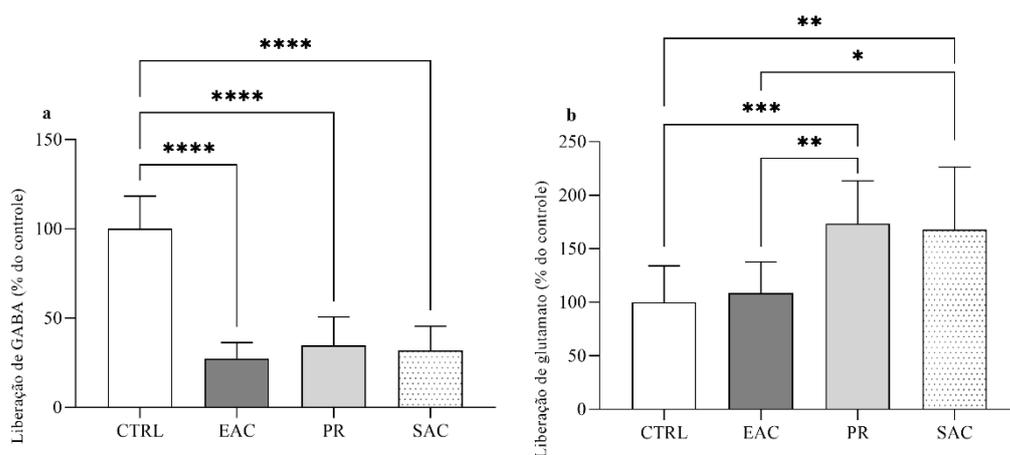


Figura 9: Níveis extracelulares de GABA (A) e glutamato (B) no cérebro de zebrafish submetido a EAC, PR e SAC. Os valores foram expressos como porcentagem do controle, comparados por meio de ANOVA *one-way* seguida de teste *post hoc* de Tukey. **** $p < 0,00001$, p*** $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$, * $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, observamos que o comportamento tipo ansiedade, induzido por diferentes estímulos estressores, não apenas resulta em variações na intensidade desse comportamento, mas também provoca alterações neuroquímicas distintas. Esses achados ressaltam a complexidade dos transtornos de ansiedade, evidenciando que diferentes estados patológicos podem surgir em função da natureza do estímulo estressor.

Os estressores de restrição espacial, mecânico e químico são amplamente utilizados para avaliar marcadores associados ao estresse e ao comportamento tipo ansiedade em zebrafish. Além disso, o teste de Distribuição Vertical Elicida pela Novidade (DVN) utiliza a locomoção vertical como um parâmetro para avaliar comportamentos tipo ansiedade, devido a tendência do animal de escapar da superfície da água (KYSIL et al., 2017). Resultados anteriores do nosso grupo demonstraram que, quando os peixes são submetidos a Estresse Agudo de Contenção, há uma redução no tempo que eles passam no topo do aparato (ASSAD et al., 2020; LUCAS LUZ et al., 2021). Em conjunto, estes estudos indicam que o aumento da exploração na zona superior do tanque pode estar relacionado com um “estado de humor mais elevado” ou “menor ansiedade”, enquanto a permanência na zona inferior pode refletir um comportamento ansiogênico (KALUEFF et al., 2013). Nossos resultados estão em consonância com essa compreensão, demonstrando que os animais expostos ao estresse agudo exibiram um comportamento ansiogênico significativo no DVN, incluindo uma redução acentuada no tempo gasto no topo. No entanto, embora todos os grupos expostos a um tipo de estressor tenham mostrado uma diminuição geral no tempo de exploração no topo, os animais submetidos à Substância de Alarme e à Perseguição com Rede apresentaram uma redução ainda mais pronunciada nesse parâmetro. Anteriormente, Egan *et al.* (2010) também observaram que a exposição à substância de alarme de forma aguda, mas não crônica, foi capaz de induzir comportamento tipo ansiedade de forma robusta, sendo observado pela redução do tempo gasto no topo, aumento do tempo de congelamento e movimentos erráticos.

O zebrafish, quando exposto a condições aversivas, tende a adotar estratégias de defesa que incluem desde a preferência por ambientes mais seguros no fundo do tanque até o aumento do tempo de congelamento (KALUEFF et al., 2013). Os dados do presente estudo corroboram essa observação, demonstrando que os estressores utilizados induziram um aumento no tempo de congelamento dos animais. No entanto, esse efeito

foi mais acentuado nos grupos expostos a estímulos de estresse físico ou químico em comparação com o grupo submetido a restrição espacial ou controle. Dois tipos de estados comportamentais podem ser identificados após a administração de estímulos aversivos: uma resposta fásica (sugestão explícita de medo) e um estado mais sustentado e proeminente para o contexto experimental (comportamento tipo ansiedade). Mongeau *et al.* (2003) propõem que animais com baixo nível de ansiedade tendem a fugir quando confrontados com um estímulo aversivo, enquanto animais altamente “ansiosos” congelam por longos períodos. No presente estudo observamos que os animais expostos aos diferentes tipos de estresse aumentaram a frequência de natação errática. Curiosamente, notamos uma resposta comportamental diferenciada entre os tipos de estressores na qual os grupos PR e SAC apresentaram frequências mais altas em comparação ao grupo EAC, de forma ainda mais pronunciada no grupo SAC. Estes achados estão alinhados com as observações de Cachat *et al.* (2011), que demonstraram que a exploração inibida, a velocidade reduzida e o aumento da frequência de movimentos erráticos semelhantes a fugas são comumente associados a níveis mais altos do comportamento tipo ansiedade provocados por estressores. Esses fatores ansiogênicos parecem ter sido decisivos no comprometimento locomotor dos animais submetidos apenas ao estresse físico e químico, onde observamos uma diminuição na velocidade média de exploração. Além disso, provavelmente devido ao aumento dos movimentos erráticos, caracterizados por mudanças rápidas e imprevisíveis na direção do nado, os grupos PR e SAC demonstraram uma velocidade máxima maior em comparação com os animais submetidos à restrição espacial. Essas descobertas apoiam a hipótese de que a exposição a diferentes tipos de estressores induz variações na magnitude do comportamento tipo ansiedade. Isso sugere a participação de diferentes neurocircuitos na avaliação da natureza e da intensidade do estímulo, resultando em respostas comportamentais específicas.

Eventos altamente aversivos acionam estruturas límbicas e do tronco cerebral que induzem estados comportamentais negativos. Assim, a amígdala representa a estrutura límbica envolvida na geração de comportamento tipo ansiedade induzido pelo estresse agudo, onde cada núcleo é especializado em conexões neurais distintas (TOVOTE; FADOK; LÜTHI, 2015). É amplamente reconhecido que o sistema GABAérgico desempenha um papel crucial no transtorno de ansiedade. A diminuição dos níveis deste neurotransmissor no sistema límbico está frequentemente associada ao aumento da excitabilidade, o que contribui para os sintomas típicos do transtorno de ansiedade e

comportamentos relacionados (ASSAD et al., 2020; WIEROŃSKA et al., 2011). Assim, níveis reduzidos de GABA no cérebro estão associados a comportamentos tipo ansiogênicos em animais (ARORA et al., 2024; ASSAD et al., 2020; LUCAS LUZ et al., 2021). No presente estudo, confirmamos que todos os estímulos ansiogênicos utilizados foram eficazes em alterar o sistema GABAérgico, evidenciado pela diminuição na liberação desse neurotransmissor. No entanto, ao analisar o padrão de liberação de glutamato induzido pelos estressores, constatamos que apenas os estressores físicos e químicos aumentaram a liberação deste neurotransmissor no cérebro do zebrafish, ao passo que o grupo exposto ao estressor por restrição espacial não apresentou esse aumento. Nesse sentido, nossos dados estão vinculados aos encontrados por Assad *et al.* (2020), que relataram que o estresse agudo de restrição pode inativar o subnúcleo Vs do telencéfalo do zebrafish, que é associado à amígdala central dos mamíferos e contém uma maior quantidade de neurônios GABAérgicos. Como resultado, os níveis de GABA são reduzidos, enquanto a ativação das regiões Dm e Dl, relacionadas à amígdala basolateral dos mamíferos e predominantemente compostas por neurônios glutamatérgicos, não é alterada, mantendo os níveis de glutamato inalterados. Estes dados sugerem que o comportamento tipo ansiedade induzido pelo estresse agudo de contenção foi mediado apenas pela disfunção GABAérgica. Portanto, nossa hipótese é que o baixo impacto da resposta a um estressor de restrição espacial (EAC) pode estar associado à ativação ou inativação de regiões cerebrais específicas, enquanto estressores de outras naturezas, como físicos e químicos, podem envolver diferentes vias para a percepção do estímulo.

Assim como na BLA, que contém 80% de neurônios glutamatérgicos e apenas 20% de neurônios GABAérgicos, a maioria dos neurônios em Dm expressa o Transportador Vesicular de Glutamato 2 (Vglut2), enquanto apenas uma pequena fração expressa as isoformas 65 e 67 da enzima Glutamato Descarboxilase (GAD65/67) (VON TROTHA; VERNIER; BALLY-CUIF, 2014). Além disso, a região Dm recebe projeções sensoriais do tálamo (incluindo as vias somatosensorial, visual e auditiva) e do complexo pré-glomerular (gustativo e olfativo), e envia projeções para as sub-regiões do núcleo ventral e para a substância cinzenta periaquedutal (LAL; KAWAKAMI, 2022; NORTHCUTT, 2006). Em nossos resultados, observamos um padrão diferencial na liberação de glutamato, que foi detectado exclusivamente nos animais expostos a estressores químicos e físicos, mas ausente nos submetidos à restrição espacial. Esses dados sugerem que estímulos aversivos de natureza sensorial podem induzir um aumento de glutamato no subnúcleo Dm, que possui projeções eferentes para diversos núcleos

hipotalâmicos (Hip) e para a substância cinzenta periaquedutal (PAG), regiões especializadas na geração de comportamentos defensivos associados a reações extremas de defesa (BENARROCH, 2012; BRANDÃO et al., 2008; CALHOON; TYE, 2015). Este pode ser um caminho importante na mediação do comportamento tipo ansiedade induzido por estressores químicos e físicos.

Atualmente, as estratégias farmacológicas para tratar o transtorno de ansiedade concentram-se na modulação positiva dos receptores GABAérgicos, com o objetivo de restaurar o controle da excitabilidade dos circuitos locais. Entre os medicamentos utilizados, os benzodiazepínicos são os mais comuns (DALVI; RODGERS, 1996; NUSS, 2015). No entanto, apesar de serem a primeira linha de tratamento, alguns efeitos adversos têm sido relatados, como dependência, sedação, comprometimento da memória e sonolência (BALDWIN et al., 2013), além de um início de ação lento, que pode levar de 4 a 6 semanas. Portanto, há a necessidade de busca por novos moduladores que possam alterar a função neuronal e os processos comportamentais com maior tolerabilidade. Dado o papel crucial do sistema glutamatérgico na mediação dos comportamentos ansiosos, é essencial entender os mecanismos pelos quais esse neurotransmissor modula tais comportamentos. Além disso, sugerimos que a modulação da liberação de glutamato e a sensibilização de seus receptores podem impactar diretamente a plasticidade neural e os neurocircuitos associados à ansiedade. Portanto, compreender como a sinalização glutamatérgica contribui para a manifestação de diferentes intensidades de comportamento ansioso, levando em conta o contexto e a natureza do estímulo estressor, é essencial para esclarecer os mecanismos subjacentes aos transtornos de ansiedade. Investigar essa questão pode auxiliar no desenvolvimento de terapias que abordem a natureza específica dos estímulos ansiogênicos.

6 CONCLUSÃO

Este estudo sugere fortemente que diferentes aspectos do comportamento tipo ansiedade são resultado de alterações neuroquímicas diferenciais, baseadas na ação do GABA e, principalmente, do glutamato. Ou seja, tanto os resultados comportamentais quanto os neuroquímicos são altamente dependentes do contexto, apoiando a nossa hipótese inicial. Com isso, acreditamos que a atuação do glutamato em áreas anatomicamente distintas do cérebro pode estar atreladas aos diferentes aspectos da resposta à ansiedade. Explorar essa questão pode abrir novas possibilidades farmacológicas que considerem a natureza do estímulo aversivo e oferece uma compreensão mais profunda da patogênese dos transtornos de ansiedade induzidos pelo estresse agudo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALSOP, D.; VIJAYAN, M. The zebrafish stress axis: Molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event. **General and Comparative Endocrinology**, v. 161, n. 1, p. 62–66, 2009.
- ALSOP, D.; VIJAYAN, M. M. Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 3, p. 711–719, 2008.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5, 5. ed. Washington, DC, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). Stress effects on the body. Washington, DC, 2023. Disponível em: <https://www.apa.org/topics/stress/body>
- ANAND, A.; SHEKHAR, A. Brain Imaging Studies in Mood and Anxiety Disorders. **New York Academy of Sciences**, v. 985, n. 1, p. 370–388, 2003.
- ARORA, I. et al. GABAergic implications in anxiety and related disorders. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 724, 2024.
- ASSAD, N. et al. Acute Restraint Stress Evokes Anxiety-Like Behavior Mediated by Telencephalic Inactivation and GABAergic Dysfunction in Zebrafish Brains. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2020.
- BAGLEY, J.; MOGHADDAM, B. Temporal dynamics of glutamate efflux in the prefrontal cortex and in the hippocampus following repeated stress: Effects of pretreatment with saline or diazepam: **Neuroscience**, v. 77, n. 1, p. 65–73, 1997.
- BALDWIN, D. S. et al. Benzodiazepines: Risks and benefits . A reconsideration. **Journal of Psychopharmacology**, v. 27, p. 967–971, 2013.
- BARBALHO, C. A.; NUNES-DE-SOUZA, R. L.; CANTO-DE-SOUZA, A. Similar anxiolytic-like effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist and antagonist: Evidence for the release of an endogenous benzodiazepine inverse agonist in mice exposed to elevated plus-maze test. **Brain Research**, v. 1267, p. 65–76, 2009.
- BARKUS, C. et al. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: At the interface between cognition and emotion. **European Journal of Pharmacology**, v. 626, n. 1, p. 49–56, 2010.
- BARROS, T. P. et al. Zebrafish: An emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. **British Journal**

of Pharmacology, v. 154, n. 7, p. 1400–1413, 2008.

BARTOSZEK, E. M. et al. Ongoing habenular activity is driven by forebrain networks and modulated by olfactory stimuli. **Current Biology**, v. 31, n. 17, p. 3861–3874.e3, 2021.

BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: A review. **Behavioural Brain Research**, v. 125, n. 1–2, p. 141–149, 2001.

BENARROCH, E. E. Periaqueductal gray: An interface for behavioral control. **Clinical Implications of Neuroscience Research**, v. 78, p. 210–217, 2012.

BERGINK, V.; VAN MEGEN, H. J. G. M.; WESTENBERG, H. G. M. Glutamate and anxiety. **European Neuropsychopharmacology**, v. 14, n. 3, p. 175–183, 2004.

BERNADETTE M, C.; K LUAN, P. The role of glutamate in anxiety and related disorders. **CNS spectrums**, v. 10, n. 10, p. 820–30, 2005.

BIGGIO, G. et al. **Stress, Ethanol, and Neuroactive Steroids**. [s.l: s.n.]. v. 116

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye binding. **Crop Journal**, v. 5, n. 5, p. 407–415, 1976.

BRANDÃO, M. L. et al. Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: Association with different types of anxiety. **Behavioural Brain Research**, v. 188, n. 1, p. 1–13, 2008.

BREMMER, D. J. et al. Neural Correlates of Exposure to Traumatic Pictures and Sound in Vietnam Combat Veterans with and without Posttraumatic Stress Disorder: A Positron Emission Tomography Study. **Biol Psychiatry**, v. 45, n. 7, p. 806–816, 1999.

BREMNER, J. D. et al. Decreased benzodiazepine receptor binding in prefrontal cortex in combat-related posttraumatic stress disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 157, n. 7, p. 1120–1126, 2000.

CACHAT, J. M. et al. Modeling Stress and Anxiety in Zebrafish. **Neuromethods**, v. 52, n. 3, 2011.

CALHOON, G. G.; TYE, K. M. Resolving the neural circuits of anxiety. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1394–1404, 2015.

CANAVELLO, P. R. et al. Measuring Endocrine (Cortisol) Responses of Zebrafish to Stress. **Neuromethods**, v. 51, n. 2, p. 135–142, 2011.

CANNISTRARO, P. A.; RAUCH, S. L. Neural Circuitry of Anxiety: Evidence from Structural and Functional Neuroimaging Studies. **Psychopharmacol Bulletin**, v. 37, n.

4, 2003.

CHATTARJI, S. et al. Neighborhood matters: Divergent patterns of stress-induced plasticity across the brain. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1364–1375, 2015.

CHROUSOS, G. P. Stress and disorders of the stress system. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 5, n. 7, p. 374–381, 2009.

CONRAD, C. D. What is the functional significance of chronic stress-induced CA3 dendritic retraction within the hippocampus? **Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews**, v. 5, n. 1, p. 41–60, 2006.

COOK, C. J. Stress induces CRF release in the paraventricular nucleus, and both CRF and GABA release in the amygdala. **Physiology and Behavior**, v. 82, n. 4, p. 751–762, 2004.

COURTIN, J. et al. Medial prefrontal cortex neuronal circuits in fear behavior. **Neuroscience**, v. 240, n. March, p. 219–242, 2013.

CRASKE, M. G. et al. Anxiety disorders. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. May, p. 1–18, 2017.

CRASKE, M. G.; STEIN, M. B. Anxiety. **The Lancet**, v. 388, n. 10063, p. 3048–3059, 2016.

CULLINAN, W. E.; ZIEGLER, D. R.; HERMAN, J. P. Functional role of local GABAergic influences on the HPA axis. **Brain Structure and Function**, v. 213, n. 1–2, p. 63–72, 2008.

DALVI, A.; RODGERS, R. J. GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. **Psychopharmacology**, v. 128, n. 4, p. 380–397, 1996.

DE ABREU, M. S. et al. Diazepam and fluoxetine decrease the stress response in zebrafish. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1–5, 2014.

DEGROOT, A.; TREIT, D. Anxiety is functionally segregated within the septo-hippocampal system. **Brain Research**, v. 1001, n. 1–2, p. 60–71, 2004.

DIAZ-VERDUGO, C. et al. Mating Suppresses Alarm Response in Zebrafish. **Current Biology**, v. 29, n. 15, p. 2541–2546.e3, 2019.

DULKA, B. N. et al. Chemogenetic activation of an infralimbic cortex to basolateral amygdala projection promotes resistance to acute social defeat stress. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.

EGAN, R. J. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 205, n. 1, p. 38–44, 2010.

FELIX-ORTIZ, A. C. et al. BLA to vHPC Inputs Modulate Anxiety-Related Behaviors.

Neuron, v. 79, n. 4, p. 658–664, 2013.

FORSTER, G. L. et al. The Role of the Amygdala in Anxiety Disorders. **IntechOpen Journals**, 2012.

FRISCH, K. VON. Über einen Schreckstoff der Fischhaut und seine biologische Bedeutung. **Zeitschrift für Vergleichende Physiologie**, v. 29, n. 1–2, p. 46–145, 1941.

GADEK-MICHALSKA, A. et al. Influence of chronic stress on brain corticosteroid receptors and HPA axis activity. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 5, p. 1163–1175, 2013.

GANZ, J. et al. Subdivisions of the adult zebrafish subpallium by molecular marker analysis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 520, n. 3, p. 633–655, 2012.

GASPARINI, F. et al. 2-Methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine (MPEP), a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist. **Neuropharmacology**, v. 38, n. 10, p. 1493–1503, 1999.

GHIT, A. et al. GABA A receptors : structure , function , pharmacology , and related disorders. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, 2021.

GILLESPIE, C. F. et al. Risk and Resilience: Genetic and Environmental Influences on Development of the Stress Response. **Depression and anxiety**, v. 26, n. 11, p. 984–992, 2009.

GJERSTAD, J. K.; LIGHTMAN, S. L.; SPIGA, F. Role of glucocorticoid negative feedback in the regulation of HPA axis pulsatility. **Stress**, v. 21, n. 5, p. 403–416, 2018.

GODOY, L. D. et al. A comprehensive overview on stress neurobiology: Basic concepts and clinical implications. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, n. July, p. 1–23, 2018.

GRIFFITHS, B. et al. A zebrafish model of glucocorticoid resistance shows serotonergic modulation of the stress response. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 6, n. SEPTEMBER, p. 1–10, 2012.

GRUNWALD, D. J.; EISEN, J. S. Taking stock of our models: The function and future of stock centres. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 9, p. 711–717, 2002.

HELDT, S. A.; MOU, L.; RESSLER, K. J. In vivo knockdown of GAD67 in the amygdala disrupts fear extinction and the anxiolytic-like effect of diazepam in mice. **Translational Psychiatry**, v. 2, n. 11, p. e181-12, 2012.

HERMAN, J. P. et al. Neural regulation of the stress response: Glucocorticoid feedback mechanisms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 4, p. 292–298, 2012.

- HERMANS, E. J. et al. Dynamic adaptation of large-scale brain networks in response to acute stressors. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 6, p. 304–314, 2014.
- JAMES, K. A. et al. Understanding the relationships between physiological and psychosocial stress, cortisol and cognition. **Frontiers in Endocrinology**, v. 14, n. March, p. 1–20, 2023.
- JEZOVA, D.; SCHWENDT, M. Adrenal glutamate receptors: A role in stress and drug addiction? **Glutamate Receptors in Peripheral Tissue: Excitatory Transmission Outside the CNS**, p. 169–178, 2005.
- JOËLS, M. et al. Learning under stress: how does it work? **Trends in Cognitive Sciences**, v. 10, n. 4, p. 152–158, 2006.
- JOËLS, M. et al. Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus. **Stress**, v. 7, n. 4, p. 221–231, 2009.
- KALUEFF, A. V. et al. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 70–86, 2013.
- KALUEFF, A. V.; NUTT, D. J. ROLE OF GABA IN ANXIETY AND DEPRESSION. **International Journal of Current Advanced Research**, v. 4, n. 11, p. 485–487, 2007.
- KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends Pharmacol Sci**, v. 35, n. 2, p. 63–75, 2014.
- KASH, S. F. et al. Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 4, p. 1698–1703, 1999.
- KHAN, K. M. et al. Zebrafish models in neuropsychopharmacology and CNS drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 13, p. 1925–1944, 2017.
- KHEIRBEK, M. A.; TANNENHOLZ, L.; HEN, R. NR2B-dependent plasticity of adult-born granule cells is necessary for context discrimination. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 25, p. 8696–8702, 2012.
- KIM, S. Y. et al. Diverging neural pathways assemble a behavioural state from separable features in anxiety. **Nature**, v. 496, n. 7444, p. 219–223, 2013.
- KYSIL, E. V. et al. Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests. **Zebrafish**, v. 14, n. 3, p. 197–208, 2017.
- LAINE, M. A.; SHANSKY, R. M. Rodent models of stress and dendritic plasticity – Implications for psychopathology. **Neurobiology of Stress**, v. 17, p. 100438, 2022.
- LAL, P.; KAWAKAMI, K. Integrated Behavioral, Genetic and Brain Circuit Visualization Methods to Unravel Functional Anatomy of Zebrafish Amygdala.

Frontiers in Neuroanatomy, v. 16, n. May, p. 1–9, 2022.

LANTZ-MCPEAK, S. et al. Developmental toxicity assay using high content screening of zebrafish embryos. **J Appl Toxicol**, v. 176, n. 1, p. 100–106, 2016.

LAU, B. Y. B. et al. Identification of a brain center whose activity discriminates a choice behavior in zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 6, p. 2581–2586, 2011.

LI, G. et al. Impact of infralimbic inputs on intercalated amygdala neurons: A biophysical modeling study. **Learning and Memory**, v. 18, n. 4, p. 226–240, 2011.

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

MALIZIA, A. L.; CUNNINGHAM, V. J.; BELL, C. J. Decreased Brain GABA. **Arch Gen Psychiatry**, v. 55, p. 715–720, 1998.

MAXIMINO, C.; HERCULANO, A. M. A review of monoaminergic neuropsychopharmacology in zebrafish. **Zebrafish**, v. 7, n. 4, p. 359–378, 2010.

MCCALL, J. G. et al. CRH Engagement of the Locus Coeruleus Noradrenergic System Mediates Stress-Induced Anxiety. **Neuron**, v. 87, n. 3, p. 605–620, 2015.

MCEWEN, B. S. Effects of adverse experiences for brain structure and function. **Biological Psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 721–731, 2000.

MCEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 3, p. 873–904, 2007.

MCEWEN, B. S. et al. McEwen. Stress Mechanisms Brain. 2015. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1353–1363, 2015.

MCEWEN, B. S.; AKIL, H. Revisiting the stress concept: Implications for affective disorders. **Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 1, p. 12–21, 2020.

MILLAN, M. J. The neurobiology and control of anxious states. **Progress in Neurobiology**, v. 70, p. 83–244, 2003.

MITRA, R.; SAPOLSKY, R. M. Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 14, p. 5573–5578, 2008.

MOGHADDAM, B. Stress Preferentially Increases Extraneuronal Levels of Excitatory Amino Acids in the Prefrontal Cortex: Comparison to Hippocampus and Basal Ganglia. **Journal of Neurochemistry**, v. 60, n. 5, p. 1650–1657, 1993.

- MONGEAU, R. et al. Neural correlates of competing fear behaviors evoked by an innately aversive stimulus. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 9, p. 3855–3868, 2003.
- MORAES, E. R. DA S. et al. Determination of glutamate uptake by high performance liquid chromatography (HPLC) in preparations of retinal tissue. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 907, p. 1–6, 2012.
- MUELLER, T. et al. The dorsal pallium in zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Teleostei). **Brain Research**, v. 1381, p. 95–105, 2011.
- MYERS, K. M.; CARLEZON, W. A.; DAVIS, M. Glutamate receptors in extinction and extinction-based therapies for psychiatric illness. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 1, p. 274–293, 2011.
- NATIONAL INSTITUTE ON DRUG ABUSE (NIDA). Common Comorbidities with Substance Use Disorders Research Report. 2024 Disponível em: <https://nida.nih.gov/publications/research-reports/common-comorbidities-substance-use-disorders/references>
- NIEWOEHNER, B. et al. Impaired spatial working memory but spared spatial reference memory following functional loss of NMDA receptors in the dentate gyrus. **European Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 3, p. 837–846, 2007.
- NORRHOM, S. D.; RESSLER, K. J. Genetics of Anxiety and Trauma-Related Disorders. **Neuroscience**, v. 164, n. 1, p. 272–287, 2009.
- NORTHCUTT, R. G. Connections of the lateral and medial divisions of the goldfish telencephalic pallium. **Journal of Comparative Neurology**, v. 494, n. 6, p. 903–943, 2006.
- NUSS, P. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: A disturbance of modulation. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 11, p. 165–175, 2015.
- NUTT, D. J.; MALIZIA, A. L. New insights into the role of the GABAA-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. **British Journal of Psychiatry**, v. 179, n. NOV., p. 390–396, 2001.
- O’CONNOR, D. B.; THAYER, J. F.; VEDHARA, K. Stress and Health: A Review of Psychobiological Processes. **Annual Review of Psychology**, v. 72, p. 663–688, 2021.
- PALUCHA, A. et al. Potential antidepressant-like effects of MPEP, a potent, selective and systemically active mGluR5 receptor antagonist. **European Neuropsychopharmacology**, v. 11, p. S228–S229, 2001.
- PANULA, P. et al. Modulatory neurotransmitter systems and behavior: Towards

- zebrafish models of neurodegenerative diseases. **Zebrafish**, v. 3, n. 2, p. 235–247, 2006.
- PAVLIDIS, M.; THEODORIDI, A.; TSALAFOUTA, A. Neuroendocrine regulation of the stress response in adult zebrafish, *Danio rerio*. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 60, p. 121–131, 2015.
- PEEDICAYIL, J. Genome – Environment Interactions and Psychiatric Disorders. **Biomedicines**, 2023.
- PIATO, A. L. et al. Acute restraint stress in zebrafish: Behavioral parameters and purinergic signaling. **Neurochemical Research**, v. 36, n. 10, p. 1876–1886, 2011.
- PINHEIRO-DA-SILVA, J. et al. Sleep deprivation effects on object discrimination task in zebrafish (*Danio rerio*). **Animal Cognition**, v. 20, n. 2, p. 159–169, 2017.
- POPOLI, M. et al. The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nat Rev Neurosci**, v. 13, n. 1, p. 22–37, 2013.
- PORTER, B. A.; MUELLER, T. The Zebrafish Amygdaloid Complex – Functional Ground Plan, Molecular Delineation, and Everted Topology. **Frontiers in Neuroscience**, v. 14, n. July, 2020.
- REISS, F. et al. Socioeconomic status, stressful life situations and mental health problems in children and adolescents: Results of the German BELLA cohort-study. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, p. 1–16, 2019.
- RESSLER, K. J.; NEMEROFF, C. B. Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. **Depression and Anxiety**, v. 12, n. SUPPL. 1, p. 2–19, 2000.
- RIAZA BERMUDO-SORIANO, C. et al. New perspectives in glutamate and anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 4, p. 752–774, 2012.
- RICO, E. P. et al. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 33, n. 6, p. 608–617, 2011.
- ROBINSON, O. J. et al. The translational neural circuitry of anxiety. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 90, n. 12, p. 1353–1360, 2019.
- ROYER, S.; PARÉ, D. Bidirectional synaptic plasticity in intercalated amygdala neurons and the extinction of conditioned fear responses. **Neuroscience**, v. 115, n. 2, p. 455–462, 2002.
- SANDERS, S. K.; SHEKHAR, A. Regulation of anxiety by GABAA receptors in the rat amygdala. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 52, n. 4, p. 701–706, 1995.
- SANDI, C. Stress and cognition. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science**, v. 4, n. 3, p. 245–261, 2013.

- SAPOLSKY, R. M. Stress and Plasticity in the Limbic System. **Neurochemical Research**, v. 28, n. 11, p. 1735–1742, 2003.
- SCHNEIDERMAN, N.; IRONSON, G.; SIEGEL, S. D. Stress and health: Psychological, behavioral, and biological determinants. **Annual Review of Clinical Psychology**, v. 1, n. Lacey 1967, p. 607–628, 2005.
- SEGAN, L. et al. Atrial Fibrillation and Stress: A 2-Way Street? **JACC: Clinical Electrophysiology**, v. 8, n. 8, p. 1051–1059, 2022.
- SOUSA, N.; CERQUEIRA, J. J.; ALMEIDA, O. F. X. Corticosteroid receptors and neuroplasticity. **Brain Research Reviews**, v. 57, n. 2, p. 561–570, 2008.
- SPOOREN, W. P. J. M. et al. Effects of the prototypical mGlu5 receptor antagonist 2-methyl-6-(phenylethynyl)-pyridine on rotarod, locomotor activity and rotational responses in unilateral 6-OHDA-lesioned rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 406, n. 3, p. 403–410, 2000.
- STARCKE, K.; BRAND, M. Decision making under stress: A selective review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, n. 4, p. 1228–1248, 2012.
- STEWART, A. et al. Modeling Anxiety in Zebrafish Review. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 135–143, 2012.
- STEWART, A. M. et al. Perspectives on experimental models of serotonin syndrome in zebrafish. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 6, p. 893–902, 2013.
- STEWART, A. M. et al. Aquatic toxicology of fluoxetine: Understanding the knowns and the unknowns. **Aquatic Toxicology**, v. 156, p. 269–273, 2014.
- STEWART, A. M. et al. Molecular psychiatry of zebrafish. **Mol Psychiatry**, v. 20128, n. 1, p. 2–17, 2015.
- TATARCZYŃSKA, E. et al. The antianxiety-like effects of antagonists of group I and agonists of group II and III metabotropic glutamate receptors after intrahippocampal administration. **Psychopharmacology**, v. 158, n. 1, p. 94–99, 2001.
- TOVOTE, P.; FADOK, J. P.; LÜTHI, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 317–331, 2015.
- TURRINI, L. et al. Imaging Approaches to Investigate Pathophysiological Mechanisms of Brain Disease in Zebrafish. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 12, 2023.
- TYE, K. M. et al. Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. **Nature**, v. 471, n. 7338, p. 358–362, 2011.
- VIDAL-GONZALEZ, I. et al. Microstimulation reveals opposing influences of prelimbic

- and infralimbic cortex on the expression of conditioned fear. **Learning and Memory**, v. 13, n. 6, p. 728–733, 2006.
- VON TROTHA, J. W.; VERNIER, P.; BALLY-CUIF, L. Emotions and motivated behavior converge on an amygdala-like structure in the zebrafish. **European Journal of Neuroscience**, v. 40, n. 9, p. 3302–3315, 2014.
- VYAS, A. et al. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 15, p. 6810–6818, 2002.
- WANG, S. et al. Targeting NMDA Receptors in Emotional Disorders: Their Role in Neuroprotection. **Brain Sciences**, v. 12, n. 10, 2022.
- WIEROŃSKA, J. M. et al. The Loss of Glutamate-GABA Harmony in Anxiety Disorders. **Anxiety Disorders**, 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Transforming mental health for all**. Geneva: World Health Organization; 2022.
- WULLIMANN, M. F.; MUELLER, T. Teleostean and mammalian forebrains contrasted: Evidence from genes to behavior. **Journal of Comparative Neurology**, v. 475, n. 2, p. 143–162, 2004.
- YARIBEYGI, H. et al. The impact of stress on body function: A review. **EXCLI Journal**, v. 16, p. 1057–1072, 2017.
- ZHANG, J. et al. Chronic Stress Remodels Synapses in an Amygdala Circuit– Specific Manner. **Biol Psychiatry**, v. 85, n. 3, p. 189–201, 2019a.
- ZHANG, X. et al. Chronic stress promotes gastric cancer progression and metastasis: an essential role for ADRB2. **Cell Death and Disease**, v. 10, n. 11, 2019b.