



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

**Sensibilização dependente de tempo em paulistinhas adultos como modelo
de transtorno de estresse pós-traumático: Papel do óxido nítrico**

MONICA GOMES LIMA

Orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano

Co-Orientador: Prof. Dr. Caio Maximino

Belém/PA

2015



MONICA GOMES LIMA

Sensibilização dependente de tempo em paulistinhas adultos como modelo de transtorno de estresse pós-traumático: Papel do óxido nítrico

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Neurociências e Biologia Celular Área de concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano

Co-orientador: Prof. Dr. Caio Maximino

Belém/PA

2015

CIP – Catalogação na Publicação

GL732s Gomes Lima, Monica, 1982-

Sensibilização dependente de tempo em paulistinhas adultos como modelo de transtorno de estresse pós traumático: Papel do óxido nítrico / Monica Gomes Lima - 2015

Orientador: Anderson Manoel Herculano

Co-orientador: Caio Maximino

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém/PA, 2015

1. Transtorno de estresse pós-traumático. 2. Danio rerio. 3. Óxido nítrico. 4. Sensibilização dependente de tempo. I. Herculano, Anderson Manoel, orient. II. Maximino, Caio, co orient. III. Título.

CDD: 616.8

CDU: 615

Dedico este trabalho ao meu esposo, Caio, e a minha filha, Sofia, por tornarem esses últimos meses menos traumático e estressante que os de costume.

“O começo de todas as ciências é o espanto
de as coisas serem o que são”.

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano, pela oportunidade em realizar este trabalho, pelas orientações e acolhimento em seu laboratório.

Agradeço ao meu co-orientador, Prof. Dr. Caio Maximino, por todas as orientações, discussões, além do apoio, companheirismo e compreensão incondicionais ao longo dessa jornada. Muito obrigada por ter me mostrado esse mundo novo.

À Luana K. R. L. da Penha, Rhayra Xavier, Suéllen Moraes e Laís Rodrigues pela ajuda na coleta de dados.

Aos colegas do LNE, em especial à Tayana Carvalho – pelo apoio logístico com os animais – e à Martha Souza – pela ajuda com os diversos trâmites burocráticos e pelo apoio motivacional.

À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

RESUMO

LIMA, M. G. **Sensibilização dependente de tempo em paulistinhas adultos como modelo de transtorno de estresse pós-traumático: Papel do óxido nítrico**. Plano de tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2015.

O Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT) é classificado como um transtorno relacionado ao trauma e a estressores, um conjunto de doenças neuropsiquiátricas severamente debilitantes que se caracterizam por uma desregulação de respostas de estresse após um evento traumático. O paulistinha (*Danio rerio* Hamilton 1822) tem emergido como um modelo importante para o estudo de funções genéticas, neurofarmacológicas e comportamentais, como no estudo sobre ansiedade e estresse. O óxido nítrico (NO) é um gasotransmissor que parece ter um papel importante na regulação de respostas neurocomportamentais ao estresse, inclusive no paulistinha. É diante deste cenário que propomos um modelo comportamental para TEPT, com a avaliação da sensibilização dependente de tempo do comportamento do paulistinha em decorrência da exposição à substância de alarme co-específica (SA) – um potente estressor. Com esse modelo, verificaremos o papel do sistema nitrérgico nesse processo de sensibilização. Os animais serão expostos à SA e mantidos livres de estresse por 24 h; após esse período, o comportamento dos animais será analisado. Realizaremos 5 experimentos que visam investigar: i) o efeito atrasado da substância de alarme sobre diferentes tarefas comportamentais em paulistinhas, ii) a comparação da sensibilização dependente de tempo nos fenótipos *shortfin* e *longfin*, iii) a aplicação de Critérios Comportamentais de Corte na sensibilização dependente de tempo, iv) a quantificação de glutamato extracelular e nitrito tecidual no telencéfalo após exposição à substância de alarme, e v) Participação do NO na iniciação e consolidação da sensibilização dependente de tempo. Nossos resultados revelaram que: i) a substância de alarme produz sensibilização atrasada da ansiedade (aumento da geotaxia, diminuição da habituação, aumento do nado errático, aumento da frequência de *thrashing* no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade; diminuição do tempo no branco, aumento do nado errático, avaliação de risco e tigmotaxia, no teste de preferência por escuridão) e hiperexcitação (aumento da distância percorrida na primeira tentativa e a inclinação da habituação no teste de reatividade de sobressalto). ii) em relação aos animais *shortfin*, a exposição de animais *longfin* produziu maior sensibilização do tempo no compartimento branco, da avaliação

de risco e da tigmotaxia, enquanto os animais *shortfin* apresentaram frequência de nado errático maior. iii) 25,74% dos animais que foram expostos à SA alcançaram o critério de Resposta Comportamental Extrema (RCE) e 20% atingiram o critério para Resposta Comportamental Mínima (RCM); em animais não-expostos, apenas 4% alcançaram o critério de RCE e 96% alcançaram o critério de RCM. Animais classificados como RCE dispenderam menos tempo no compartimento branco, com entradas de menor duração, maior tigmotaxia e mais nado errático em relação a animais classificados como RCM e controles não-expostos; iv) o tratamento com L-NAME 30 minutos antes da exposição à SA não bloqueou a sensibilização comportamental no teste de preferência por escuridão; v) o tratamento com L-NAME 30 minutos após a exposição à SA bloqueou a sensibilização da escototaxia e da avaliação de risco; vi) o tratamento com L-NAME 90 minutos após a exposição à SA bloqueou a sensibilização da avaliação de risco, nado errático e tigmotaxia. Esses resultados sugerem que a sensibilização dependente de tempo no paulistinha pode ser um bom modelo para estudo do TEPT e apontam o NO com um importante mediador nesse processo.

Palavras-chave: Transtorno de estresse pós-traumático; *Danio rerio*; Óxido nítrico; Sensibilização dependente de tempo

ABSTRACT

LIMA, M. G. **Sensibilização dependente de tempo em paulistinhas adultos como modelo de transtorno de estresse pós-traumático: Papel do óxido nítrico**. Plano de tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2015.

Post-traumatic stress disorder (PTSD) is classified as a trauma- and stressor-related disorder, a set of severely debilitating neuropsychiatric disorders characterized by the dysregulation of stress responses after a traumatic event. Zebrafish (*Danio rerio* Hamilton 1822) emerged as an important model organism for the study of genetic, neuropharmacological and behavioral functions, such as the study of anxiety and stress. Nitric oxide (NO) is a gaseous transmitter that appears to have an important role in the regulation of neurobehavioral responses to stress, including in zebrafish. In this scenario, we propose a behavioral model for PTSD in the evaluation of the time-dependent sensitization of behavior in zebrafish as a consequence of the exposure to conspecific alarm substance (AS) – a potent stressor. Using this model, we will verify the role of the nitergic system in this process of sensitization. Animals will be exposed to AS and kept stress-free for 24 h; after this interval, animals' behavior will be analyzed. 5 experiments will be made to investigate: i) the delayed effect of alarm substance on different behavioral tasks in zebrafish, ii) a comparison of time-dependent sensitization on *shortfin* and *longfin* phenotypes; a comparação da sensibilização dependente de tempo nas linhagens *shortfin* e *longfin*, iii) the application of Behavioral Cutoff Criteria on time-dependent sensitization, iv) the quantification of extracellular glutamate and tissue nitrite in the telencephalon after exposure to alarm substance, and v) the participation of NO on the initiation and consolidation of time-dependent sensitization. Our results revealed that: i) alarm substance produces a delayed sensitization of anxiety (increased geotaxis, decreased habituation, increased erratic swimming and thrashing in the novel tank test; decreased time on white, increased erratic swimming, risk assessment and thigmotaxis on the light/dark test) and arousal (increased swim distance on the first trial and increased habituation slope in the startle reactivity test). ii) In relation to *shortfin* animals, exposure of *longfin* zebrafish to AS sensitized time on white, risk assessment and thigmotaxis more, while *shortfin* animals had more erratic swimming. Iii) 25.74% of AS-exposed animals reached criteria for Extreme Behavioral Response (EBR), and 20% reached criteria for Minimal Behavioral Response

(MBR); in non-exposed animals, only 4% reached criteria for EBR and 96% reached criteria for MBR. Animals classified as EBR spent less time in the white compartment, with shorter entries, more thigmotaxis and more erratic swimming than animals classified as MBR and non-exposed controls. iv) treatment with L-NAME 30 minutes before AS exposure did not block the behavioral sensitization in the light/dark test; v) treatment with L-NAME 30 minutes after AS exposure blocked the sensitization of scototaxis and risk assessment; vi) treatment with L-NAME 90 minutes after AS exposure blocked the sensitization of risk assessment, erratic swimming and thigmotaxis. These results suggest that time dependent sensitization is a good model to study PTSD and point to NO as an important mediator in this process.

Keywords: Post-traumatic stress disorder; *Danio rerio*; Nitric oxide; Time-dependent sensitization

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adencorticotrófico
BNST	Núcleo leito da estria terminal
CCC	Crítérios Comportamentais de Corte
CEPAE	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficácia
CPP	Ácido 3-((<i>R</i>)-2-carboxipiperazin-4-il)-propil-1-fosfônico
CRF	Fator liberador de corticotrofina
Dc	Zona central do telencéfalo dorsal
Dd	Zona dorsal do telencéfalo dorsal
DI	Zona lateral do telencéfalo dorsal
DIPAG	Grísea periaquedutal dorsolateral
Dm	Zona medial do telencéfalo dorsal
DMH	Núcleo dorsomedial do hipotálamo
Dp	Zona caudal do telencéfalo dorsal
DR	Rafe dorsal
DSM	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
End	Núcleo entopeduncular dorsal do telencéfalo ventral
Env	Núcleo entopeduncular dorsal do telencéfalo ventral
GC	Glicocorticóides
GMP	Guanosina monofosfato
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
HHA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
HPI	Eixo hipotálamo-hipófise-interrenal
IMAO	Inibidores de monoamina oxidase
L-NAME	L-N ^G -Nitroarginina-metil-éster
LD	Ciclo de iluminação

LH	Lateral do hipotálamo
LPS	Lipopolissacarídeo
MeA	Amígdala medial
MPOA	Área pré-óptica medial
NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
NO_x	Nitrito ou nitrato
NSC-R	<i>National Comorbidity Survey Replication</i>
OPA	Ortoftaldeído
PKG	Proteína cinase dependente de GMPc
Pmd	Hipotálamo pré-mamilar dorsal
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RCE	Resposta Comportamental Externa
RCM	Resposta Comportamental Mínima
SA	Substância de alarme
SNP	Nitroprussiato de sódio
TEPT	Transtorno de estresse pós-traumático
TRTE	Transtornos relacionados ao trauma e a estressores
Vc	Núcleo central do telencéfalo ventral
Vd	Núcleo dorsal do telencéfalo 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

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Estruturas do telencéfalo límbico de mamíferos envolvidas no TEPT e que possuem influência direta sobre o eixo HHA.
- Figura 2** Efeitos imediatos e atrasados de estressores breves e intensos em neurônios principais da amígdala basolateral de roedores.
- Figura 3** Síntese do NO via NOS-1 e ação desse gasotransmissor em neurônios.
- Figura 4** Expressão de NOS-1 (metade esquerda das figuras) e atividade de NADPH-diaforase no telencéfalo de teleósteo.
- Figura 5** Altura da secção que separou o telencéfalo das estruturas mais caudais durante a dissecação.
- Figura 6** Desenho experimental relativo ao Experimento 1.
- Figura 7** Desenho experimental relativo ao Experimento 2.
- Figura 8** Desenho experimental relativo ao Experimento 3.
- Figura 9** Desenho experimental relativo ao Experimento 4.
- Figura 10** Desenho experimental relativo ao Experimento 5.
- Figura 11** A exposição à SA aumenta rapidamente a coesão do cardume.
- Figura 12** A SA sensibiliza as respostas à novidade de paulistinhas *shortfin* 24 h após a exposição.
- Figura 13** A SA sensibiliza variáveis espaço-temporais de ansiedade no teste de preferência por escuridão 24 h após a exposição em paulistinhas *shortfin*.
- Figura 14** A exposição à SA sensibiliza variáveis etológicas do teste de preferência por escuridão 24 h após a exposição em paulistinhas *shortfin*.
- Figura 15** A SA sensibiliza a excitabilidade no teste de sobressalto 24 h após a exposição em paulistinhas *shortfin*.
- Figura 16** Animais *longfin* apresentam maior sensibilização nas variáveis espaço-temporais de ansiedade no teste de preferência por escuridão.
- Figura 17** Animais *longfin* apresentam maior sensibilização na tigmotaxia, mas não nado errático, no teste de preferência por escuridão.
- Figura 18** A exposição à SA sensibiliza variáveis espaço-temporais de ansiedade no teste de preferência por escuridão em paulistinhas *longfin* 24 h após a exposição.
- Figura 19** A exposição à SA sensibiliza variáveis etológicas de ansiedade no teste de preferência por escuridão em paulistinhas *longfin* 24 h após a exposição.
- Figura 20** Animais que apresentam Resposta Comportamental Extrema diferem no tempo

no compartimento branco, mas não em outras variáveis espaço-temporais no teste de preferência por escuridão.

- Figura 21** Animais que apresentam Resposta Comportamental Extrema diferem em variáveis etológicas no teste de preferência claro/escuro.
- Figura 22** Curso temporal das alterações no conteúdo telencefálico de glutamato e NOx.
- Figura 23** O pré-tratamento com L-NAME não bloqueou a sensibilização causada pela SA 24 h após a exposição.
- Figura 24** O pré-tratamento com L-NAME não bloqueou a sensibilização causada pela SA 24 h após a exposição.
- Figura 25** O tratamento com L-NAME 30 min após o estresse bloqueou a sensibilização da escototaxia e da avaliação de risco causadas pela SA 24 h após a exposição.
- Figura 26** O tratamento com L-NAME 30 min após o estresse não bloqueou a sensibilização da tigmotaxia ou do nado errático causada pela SA 24 h após a exposição.
- Figura 27** O tratamento com L-NAME 90 min após o estresse não bloqueou a sensibilização da escototaxia causada pela SA 24 h após a exposição, mas bloqueou a sensibilização da avaliação de risco.
- Figura 28** O tratamento com L-NAME 90 min após o estresse bloqueou a sensibilização do nado errático e da tigmotaxia causada pela SA 24 h após a exposição.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. O TEPT e sua relação com a resposta disfuncional ao estresse.....	18
1.2. Sensibilização dependente de tempo como modelo animal para o transtorno de estresse pós-traumático.....	25
1.2.1. Diferenças individuais em resposta à exposição a experiências traumáticas.....	29
1.3. O sistema nitrérgico.....	30
1.3.1. NO e respostas de estresse.....	32
1.4. O paulistinha como organismo-modelo na psiquiatria biológica.....	34
1.4.1 Modelando o transtorno de estresse pós-traumático no paulistinha.....	35
1.4.2. Variáveis dependentes: Respostas comportamentais de estresse.....	37
1.4.3. Variáveis independentes: Manipulações que induzem estresse no paulistinha.....	47
1.4.4. O telencéfalo límbico do paulistinha.....	50
1.4.5. O sistema nitrérgico do paulistinha.....	55
2. Justificativa.....	59
3. Objetivos.....	59
3.1. Objetivo geral.....	59
3.2. Objetivos específicos.....	59
4. Hipóteses/questões de pesquisas.....	60
5. Métodos.....	61
5.1. Métodos gerais.....	61
5.1.1. Animais e alojamento.....	61
5.1.2. Preparação e exposição dos animais à substância de alarme.....	62
5.2. Testes comportamentais.....	63
5.2.1. Preferência por escuridão.....	63
5.2.2. Distribuição vertical eliciada pela novidade.....	65
5.2.3. Reatividade de sobressalto e habituação.....	66
5.3. Análises neuroquímicas.....	68
5.3.1. Dissecção do telencéfalo.....	68
5.3.2. Extração do conteúdo extracelular e quantificação de glutamato.....	68
5.3.3. Homogeneização do tecido e quantificação de NOx-.....	71
5.3.4. Quantificação de proteínas.....	71
5.3.4. Critérios para rejeição de outliers.....	72
5.4. Desenhos experimentais e análise estatística.....	72
5.4.1. Experimento 1: Efeito atrasado da SA sobre diferentes tarefas comportamentais em paulistinhas.....	73
5.4.2. Experimento 2: Comparação da sensibilização dependente de tempo nas linhagens shortfin e longfin.....	74
5.4.3. Experimento 3: Aplicação de critérios de corte comportamentais na sensibilização dependente de tempo.....	75
5.4.4. Experimento 4: Quantificação de glutamato extracelular e NOx- tecidual no telencéfalo após exposição à SA.....	78
5.4.5. Experimento 5: Participação da NOS na iniciação e consolidação da sensibilização dependente de tempo.....	79
5. Resultados.....	81
5.1. Efeitos agudos da exposição à SA.....	81
5.2. A SA produz sensibilização atrasada da ansiedade e hiperexcitação.....	83
5.2. A SA sensibiliza mais animais do fenótipo longfin do que animais do fenótipo shortfin.....	87
5.3. A aplicação de Critérios Comportamentais de Corte revela diferenças individuais na sensibilização à SA.....	91
5.4. A exposição à SA eleva o glutamato extracelular e o nitrito tecidual no telencéfalo.....	96

5.5. O tratamento com L-NAME 30 minutos antes da exposição à SA não bloqueia a sensibilização comportamental no teste de preferência por escuridão.....	98
5.6. O tratamento com L-NAME 30 minutos após a exposição à SA bloqueia a sensibilização da escototaxia e da avaliação de risco.....	101
5.7. O tratamento com L-NAME 90 minutos após a exposição à SA bloqueia a sensibilização da avaliação de risco, nado errático e tigmotaxia.....	104
6. Discussão.....	107
6.1. Hipótese 1: A SA deve sensibilizar o comportamento tipo-ansiedade em ambos os testes e aumentar a responsividade a estímulos de sobressalto.....	107
6.2. Hipótese 2: Os animais do fenótipo longfin serão mais susceptíveis à sensibilização dependente de tempo causada pela SA.....	110
6.3. Hipótese 3: A sensibilização dependente de tempo afeta completamente menos de 30% dos animais expostos e minimamente menos de 20% dos animais.....	112
6.4. Hipótese 4: Curso temporal das alterações glutamatérgicas e nitrérgicas após estresse.....	113
6.5 Hipótese 5: A sensibilização dependente de tempo se deve às alterações na função nitrérgica ocorridas no período posterior ao estresse.....	116
7. Conclusões.....	118
Referências.....	119
Apêndices.....	150
Apêndice A: Artigo submetido à revista Pharmacology, Biochemistry & Behavior.....	151
Apêndice B: Artigo submetido à revista Behavioural Brain Research.....	152

1. INTRODUÇÃO

O Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT) é classificado como um transtorno relacionado ao trauma e a estressores (TRTE), um conjunto de doenças neuropsiquiátricas severamente debilitantes que se caracterizam por uma desregulação do processamento de estímulos associados com o trauma (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Segundo a *National Comorbidity Survey Replication* (NSC-R), a prevalência do TEPT entre adultos norte-americanos é de cerca de 6,8%, sendo que as mulheres (9,7%) são mais propensas a desenvolver esse tipo de transtorno em algum momento de suas vidas, quando comparadas aos homens (3,6%) (KESSLER et al., 2005; NATIONAL COMORBITY SURVEY, 2005). Outros estudos examinaram a prevalência do TEPT em crianças de alto risco que experimentaram eventos traumáticos específicos (como abuso ou desastres naturais), e embora as estimativas de prevalência desse tipo de estudo varie muito, há um indicativo de que as crianças expostas a eventos traumáticos podem ter uma maior prevalência do TEPT do que os adultos na população em geral (GABBAY et al., 2004). Já entre adolescentes, a prevalência foi estimada em 3,7% para meninos e 6,3% para meninas (KILPATRICK et al., 2013).

O TEPT é um transtorno frequente e muitas vezes não diagnosticado. Seu diagnóstico é difícil, devido às inúmeras comorbidades que podem o acompanhar. Cerca de 88,3% dos homens e 79% das mulheres podem apresentar ao menos uma co-morbidade associada ao TEPT (KESSLER et al., 1995). As patologias co-mórbidas mais frequentes são transtornos de humor (em especial depressão entre 46 a 51% dos casos); transtornos de ansiedade (em 29% a 56,1%) (FERRADA-NOLI et al., 1998; HELZER; ROBINS; MCEVOYL, 1987; KESSLER et al., 1994, 1995, 2005); abuso ou dependência de substâncias psicoativas (27% a 80%) (MCFARLANE, 1998); transtorno obsessivo-compulsivo (em 13%) (HELZER; ROBINS; MCEVOYL, 1987); além de transtornos dissociativos, de personalidade e somatoformes (ANDREKI; CHILCOAT; BRESLAU, 1998; SAXE et al., 1993; SOUTHWICK; YEHUDA; GILLER JR, 1993). No Brasil, cerca de 53,3% dos pacientes com TEPT apresentam co-morbidades, sendo as mais frequentes o alcoolismo e depressão (CÂMARA FILHO; SOUGEY, 2001). Apesar da Organização Mundial da Saúde (OMS) ter começado a recolher dados epidemiológicos sobre

distúrbios de saúde mental em todo o mundo no fim dos anos 1990, as estatísticas de vários países apresentadas não são diretamente comparáveis devido a diferenças metodológicas em estratégias de administração de pesquisa e amostragem (KESSLER; USTUN, 2008).

Nos séculos XIX e XX foram descritas síndromes similares ao que hoje conhecemos como TEPT, em decorrência de conflitos como a Guerra Civil Americana, I Guerra Mundial, II Guerra Mundial e Guerra do Vietnã. A fim de descrever quadro de agitação psicomotora, hipervigilância e hiperestimulação fisiológica resultante de graves traumas psicológicos, eram utilizados termos como “coração de soldado”, “coração irri-tável”, “síndrome de Da Costa”, “*shell shock*”, “neurose de combate” e “fadiga operacional” (GLAS, 2003). Os sintomas eram observados tanto em veteranos quanto nos civis que passaram por um ou mais eventos estressantes. O TEPT foi reconhecido pela primeira vez como uma entidade nosológica distinta em 1980, com sua inclusão na terceira edição do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais da *American Psychiatric Association* (DSM-III) (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 1980).

O TEPT possui como característica essencial o desenvolvimento de sintomas que surgem, necessariamente, após a exposição do indivíduo a um ou mais eventos traumáticos aversivos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013). Conforme discrimina-se na Tabela 1, essa exposição pode gerar a presença de memórias intrusivas angustiantes que levem à rememoração da situação na qual ocorreu a exposição ao estresse – como pensamentos involuntários e intrusivos, pesadelos, reações dissociativas, *flashbacks*, e alterações fisiológicas internas (p. ex., taquicardia) e externas (p. ex., sudorese). Esses eventos de reexperiência traumática podem estar associados à esquiva persistente de estímulos (memórias, pessoas, locais, conversas, situações, objetos) intimamente associados ao evento traumático, por causar sofrimento e angústia ao indivíduo, produzindo distanciamento emocional. Esses sintomas ainda podem ser acompanhados de alterações negativas na cognição e humor, como a incapacidade de lembrar um aspecto importante do evento traumático (decorrente de amnésia dissociativa), pensamentos e opiniões pessimistas e distorcidas sobre si e outros, estado emocional negativo persistente, diminuição do interesse ou participação em atividades significantes, e in-

capacidade de experienciar emoções positivas. Finalmente, também é observada hiperexcitabilidade psíquica, incluindo hipervigilância, comportamento irritável com explosões de raiva, respostas de sobressalto exagerada, problemas de concentração e distúrbios do sono (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; BLACK; GRANT, 2014).

Embora exista um conjunto vasto de sintomas que cercam o TEPT, sua manifestação clínica varia (CÂMARA FILHO; SOUGEY, 2001). Em alguns indivíduos, de hiperexcitabilidade psíquica e esquiva podem predominar, buscando evitar revivenciar a situação aversiva. Para outros, os estados de humor anedônico (i.e., diminuição da motivação e capacidade em sentir prazer) ou disfóricos (i.e., humor negativo) associados a cognições negativas podem gerar um estado mais melancólico. Há ainda indivíduos, que apresentem de forma mais proeminente de sintomas reativos externalizantes (humor irritável ou explosões de raiva) e relacionados à hiperexcitabilidade, ou indivíduos que apresentem combinações de todos esses padrões de sintomas (CÂMARA FILHO; SOUGEY, 2001).

O TEPT e outros TRTE representam um grave problema de saúde social e público, a sua patogênese é em grande parte desconhecida. Dada a complexidade clínica do desenvolvimento e suscetibilidade aos TRTE, uma maior investigação sobre aspectos celulares e moleculares, relacionados aos fatores de risco e resiliência ao trauma, torna-se necessária. Diante disso, inúmeros modelos animais têm sido amplamente utilizados para compreender melhor os mecanismos patológicos relacionados ao TEPT e TRTE.

**Tabela 1: Critérios diagnósticos para Transtorno de Estresse Pós-Traumático
(AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013)**

<p>A. Exposição a episódio concreto ou ameaça de morte, lesão grave ou violência sexual em uma (ou mais) das seguintes formas:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Vivenciar diretamente o evento traumático;2. Testemunhar pessoalmente o evento traumático ocorrido com outras pessoas;3. Saber que o evento traumático ocorreu com familiar ou amigo próximo. Nos casos de episódio concreto ou ameaça de morte envolvendo um familiar ou amigo, é preciso que o evento tenha sido violento ou acidental;4. Ser exposto de forma repetida ou extrema a detalhes aversivos do evento traumático.	<p>D. Alterações negativas em cognições e no humor associadas ao evento traumático começando ou piorando depois da ocorrência de tá evento, conforme evidenciado por dois (ou mais) dos seguintes aspecto:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Incapacidade de recordar algum aspecto importante do evento traumático (geralmente devido a amnésia dissociativa, e não a outros fatores, como traumatismo craniano, álcool ou drogas)2. Crenças ou expectativas negativas persistentes e exageradas a respeito de si mesmo, dos outros e do mundo.3. Cognições distorcidas persistentes a respeito da causa ou das consequências do evento traumático que levam o indivíduo a culpar a si mesmo ou os outros.4. Estado emocional negativo persistente (p. ex., medo, pavor, raiva, culpa ou vergonha)5. Interesse ou participação bastante diminuída em atividades significativas.6. Sentimentos de distanciamento e alienação em relação aos outros.7. Incapacidade persistente de sentir emoções positivas.
<p>B. Presença de um (ou mais) dos seguintes sintomas intrusivos associados ao evento traumático, tendo começado depois de sua ocorrência:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Lembranças intrusivas angustiantes, recorrentes e involuntárias do evento traumático;2. Sonhos angustiantes nos quais o conteúdo e/ou sentimento do sonho estão relacionados ao evento traumático;3. Reações dissociativas (p. ex., <i>flashbacks</i>) nas quais o indivíduo sente ou age como se o evento traumático estivesse ocorrendo novamente;4. Sofrimento psicológico intenso ou prolongado ante a exposição a sinais internos ou externos que simbolizem ou se assemelhem a algum aspecto do evento traumático;5. Reações fisiológicas intensas a sinais internos ou externos que simbolizem ou se assemelhem a algum aspecto do evento traumático.	<p>E. Alterações marcantes na excitação e na reatividade associadas ao evento traumático, começando ou piorando após o evento, conforme evidenciado por dois (ou mais) dos seguintes aspectos:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Comportamento irritado e surtos de raiva (com pouca ou nenhuma provocação) geralmente expressos sob a forma de agressão verbal ou física em relação a pessoas e objetos.2. Comportamento imprudente ou autodestrutivo3. Hipervigilância4. Resposta de sobressalto exagerada5. Problemas de concentração6. Perturbações de sono
<p>C. Evitação persistente de estímulos associados ao evento traumático, começando após a ocorrência do evento, conforme evidenciado por um ou ambos dos seguintes aspectos:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Evitação ou esforços para evitar recordações, pensamentos ou sentimentos angustiantes acerca de associados de perto ao evento traumático;2. Evitação ou esforços para evitar lembranças externas (pessoas, lugares, conversas, atividades, objetos, situações) que despertem recordações, pensamentos ou sentimentos angustiantes acerca de ou associados de perto ao evento traumático.	

1.1. O TEPT e sua relação com a resposta disfuncional ao estresse

Experiências de violência e medo são conhecidas pelo homem desde o início de sua história, porém o conceito de trauma surge apenas no século XIX e somente no século XX as experiências traumáticas começaram a ser consideradas um problema de saúde (GLAS, 2003). O TEPT é desencadeado por uma resposta extrema ao estresse, provavelmente relacionada à interação entre o genoma e o ambiente durante o desenvolvimento, levando à expressão de um fenótipo vulnerável (MEHTA; BINDER, 2012).

O termo “estresse” está relacionado com o estado gerado pela percepção de estímulos que alteram a homeostasia levando a excitação emocional e a um processo de adaptação caracterizado pelo aumento de secreção de adrenalina, produzindo diversas manifestações sistêmicas, com distúrbios fisiológico e psicológico. Já o termo estressor por sua vez relaciona-se ao evento ou estímulo que provoca ou conduz ao estresse (MARGIS et al., 2003).

A resposta ao estresse é resultado da interação entre as características individuais e as demandas do meio. Esta resposta ao estressor engloba aspectos cognitivos, comportamentais e fisiológicos, com o objetivo de propiciar uma melhor percepção da situação, bem como um processamento mais rápido da informação disponível, selecionando condutas adequadas e preparando o organismo para agir de maneira rápida e vigorosa. Esses três níveis (fisiológico, cognitivo e comportamental) é eficaz até certo ponto, mas uma vez ultrapassado poderá desencadear um efeito desorganizador. É importante saber que as diferentes situações estressoras que ocorrem ao longo da vida, e as respostas a elas variam entre os indivíduos na sua forma de apresentação, podendo ocorrer manifestações psicopatológicas diversas como sintomas inespecíficos de depressão ou ansiedade, ou transtornos psiquiátricos definidos, como por exemplo o Transtorno de Estresse Pós-Traumático (CÂMARA FILHO; SOUGEY, 2001).

Em humanos a distinção de ansiedade é feita entre estado de ansiedade – medida de ansiedade aguda ou imediata– e traço de ansiedade – reflete a tendência de longo

prazo de um indivíduo para expressar ansiedade como reposta a um evento ambiental (Cattell, 1966). Devido as semelhanças entre o comportamento defensivo normal e ansiedade patológica, um entendimento das trajetórias genéticas e de desenvolvimento do medo e da ansiedade – sobretudo dos traços de ansiedade – podem ajudar a guiar a prevenção e o tratamento dos transtornos relacionados à ansiedade, dentre eles o TEPT (Gould & Gottesman, 2006; Kalueff et al., 2007). Em modelos mamíferos, ansiedade é diferenciada de medo nas bases da proximidade e certeza do estímulo aversivo. Assim, o medo é a resposta imediata para um estímulo real, enquanto a ansiedade é a resposta para uma ameaça em potencial ou distante (Gould & Gottesman, 2006; Kalueff et al., 2007).

A relação etiológica entre a exposição a eventos de vida estressores e o surgimento de sintomas e transtornos de ansiedade em geral tem sido pouco estudada. Sabe-se que os sintomas preditivos de ansiedade podem surgir anos antes de um estado de transtorno definido e completo, em resposta a eventos estressores. Dessa forma, estressores desta natureza são co-responsáveis pelo surgimento de transtornos mentais a curto, médio e longo prazo, bem como podem precipitar a recorrência de quadros psiquiátricos (MARGIS et al., 2003).

No TEPT, o evento estressor resulta em uma memória tão intensa e invasiva que gera uma série de adaptações, incluindo a hipervigilância, alterações de sono, mudanças de personalidade, déficits cognitivos e abuso de drogas (YEHUDA, 2002). Central para o TEPT – e o foco dos principais modelos animais para esse transtorno – é a reatividade aumentada para estímulos ambientais que pode levar a sintomas de ansiedade elevada (MILLER; MCEWEN, 2006); na maior parte dos casos, essas respostas são atrasadas – isto é, surgem após um intervalo de tempo – ou persistentes. Tanto as respostas atrasadas quanto as respostas persistentes podem ser explicadas por mecanismos não-associativos de medo que requerem “incubação”, déficits na habituação, e sensibilização (ADAMEC; HOLMES; BLUNDELL, 2008; BREWIN; DALGLEISH; JOSEPH, 1996; BREWIN; HOLMES, 2003; DASKALAKIS; YEHUDA; DIAMOND, 2013; SIEGMUND; WOTJAK, 2006).

Os sistemas cerebrais relacionados ao estresse compreendem uma complexa organização neuroendócrina com a participação do sistema nervoso simpático, que prepara o organismo para passar por uma situação de estresse, e de um sistema que “desligará” o primeiro, formado pelos glicocorticóides (GC), um conjunto de hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (O’CONNOR; O’HALLORAN; SHANAHAN, 2000), cuja resposta é iniciada por neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular (PVN). Cada uma dessas vias apresenta estruturas dedicadas, mas a interação entre as duas é extensa.

Classicamente, o cortisol (principal GC encontrado em humanos e peixes) é liberado por estímulos estressores agudos, incluindo os estímulos breves e intensos que caracterizam o TEPT (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; MUNCK et al., 2000). A exposição repetida a estressores homotípicos (i.e., da mesma classe ou categoria) induz à habituação dessas respostas (HERMAN, 2013). Paradoxalmente, no entanto, pacientes com TEPT parecem apresentar um eixo HHA hipofuncional (BACHMANN et al., 2005; GRAEFF, 2003; OLFF; LANGELAND; GERSON, 2005; REUL; NUTT, 2008; YEHUDA et al., 2013). Esse quadro de hipocortisolemia está relacionado com o aumento da retroalimentação negativa na hipófise devido à hipersensibilidade dos receptores de GCs (BACHMANN et al., 2005; MEHTA; BINDER, 2012; RAABE; SPENGLER, 2013); no entanto, níveis elevados de cortisol peritraumático são preditores da severidade dos sintomas (DELAHANTY; RAIMONDE; SPOONSTER, 2000; DELAHANTY et al., 2005). Esse paradoxo pode ser, em parte, explicado pelo duplo papel do cortisol na iniciação e consolidação da sensibilização de respostas aversivas, assim como na aprendizagem e extinção: se, por um lado, os GCs parecem estar envolvidos na consolidação da memória aversiva através da modulação de processos associativos na amígdala (RAIO; PHELPS, 2015; REUL; NUTT, 2008; REUL, 2014), esses esteróides adrenais também são necessários para a aprendizagem de extinção e para processos associados à inibição do medo em contextos não-apropriados (BLUNDELL et al., 2011; KNOX et al., 2012); além disso, os GCs também estão envolvidos em processos não-associativos, dado que o tratamento com antagonistas dos receptores glicocorticóides durante a consolidação bloqueia a sensibilização do

comportamento tipo-ansiedade e a hiperexcitabilidade em modelos animais (ADAMEC et al., 2007; CLAY et al., 2011). Assim, nesse modelo, o “surto” de cortisol peritraumático promove a consolidação das respostas aversivas e de fenômenos não-associativos, e a hipocortisolemia que resulta do excesso de retroalimentação impede a inibição de medo (BORGES NETO, 2011; HARTLEY; PHELPS, 2009; KORTE, 2001; MADDOX; SCHAFE; RESSLER, 2013; MATTOS, 2011; RAO; PHELPS, 2015).

As estruturas que estabelecem relação entre o ambiente e o organismo via HHA fazem parte do telencéfalo límbico, incluindo amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal (HERMAN; CULLINAN, 1997; HERMAN, 2013). Os principais núcleos que controlam a atividade do PVN – núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH), área pré-óptica medial (MPOA), e núcleo leito da estria terminal (BNST) – enviam projeções principalmente inibitórias para esse núcleo de integração neuroendócrina. O DMH recebe principalmente projeções glutamatérgicas vindas do córtex pré-frontal, hipocampo ventral, e tálamo paraventricular e projeções GABAérgicas vindas dos núcleos central e medial da amígdala e área septal (MYERS et al., 2013). A MPOA recebe entradas GABAérgicas vindas do septo, amígdala e BNST, e o BNST recebe entradas glutamatérgicas do hipocampo e núcleo basomedial da amígdala e entradas GABAérgicas dos núcleos central e medial da amígdala (MYERS et al., 2013)

Os GCs parecem agir em conjunto com outros sistemas para produzir o quadro complexo de sintomas do TEPT. Em nível celular, os GCs facilitam a liberação de GABA no hipotálamo através da liberação retrógrada de óxido nítrico (NO) e suprimem a liberação de glutamato através da liberação retrógrada de endocanabinóides (DI et al., 2009); interagindo com receptores mineralocorticóides, os GCs aumentam a liberação de glutamato na amígdala e no hipocampo (KARST et al., 2005; LOWY; GAULT; YAMAMOTO, 1993; REZNIKOV et al., 2007; VENERO; BORRELL, 1999). Nessa última estrutura, os GCs interagem com uma via dependente da ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, facilitando a ativação da proteína MSK, regulando modificações da cromatina e, como consequência, a expressão gênica (REUL; NUTT, 2008; REUL, 2014). Como resultado, o tônus glutamatérgico estará aumentando na amígdala, enquanto o tônus GABAérgico estará diminuído (RAO et al., 2009), enquanto

que, no hipocampo, a co-ativação de receptores glicocorticóides e receptores glutamatérgicos facilita a transcrição gênica e a formação da memória do evento traumático (REUL; NUTT, 2008; REUL, 2014).

Estudos de neuroimagem também revelam alterações ou danos estruturais em regiões prosencefálicas também atribuídos ao TEPT. O prosencéfalo límbico possui papel importante na memória e comportamento emocional, sendo composto por um circuito entre a substância branca e cinzenta que formam uma alça entre os hemisférios cerebrais e envolvendo conexões entre hipocampo, corpos mamilares, tálamo, giro cingulado e giro parahipocampal (LEDOUX, 2012a; LINDQUIST; BARRETT, 2012; PANKSEPP, 1998, 2011). Estudos utilizando diversas modalidades de ressonância magnética reforçam que o sistema límbico esteja comprometido no TEPT: eles mostraram que o hipocampo e giro cingulado apresentavam alterações em suas estruturas, conectividades e metabolismo em paciente com TEPT (ETKIN; WAGER, 2007; JOVANOVIC; NORRHOLM, 2011; LIBERZON; MARTIS, 2006; SARTORY et al., 2013); além disso, há evidências de que amígdala, cerebelo e ínsula também estejam alterados estrutural e funcionalmente nessa condição (ETKIN; WAGER, 2007; KARL et al., 2006; LIBERZON; MARTIS, 2006; SARTORY et al., 2013). Outros estudos mostram uma redução considerável (cerca de 5-12%) do hipocampo unilateral ou bilateralmente (SMITH, 2005). Em linhas gerais, acredita-se que as reduções de volume do hipocampo não só estão ligadas aos déficits cognitivos associados ao TEPT (incluindo alterações na memória espacial e declarativa), mas também agem como fator de risco para o desenvolvimento desse transtorno (RAO et al., 2009). Da mesma forma, a hiper-responsividade da amígdala estaria associada aos sintomas de ansiedade e à agressividade elevada, enquanto a hiporesponsividade do córtex pré-frontal seria responsável pelas alterações na função executiva e pelos déficits de extinção de medo (JOVANOVIC; NORRHOLM, 2011; MILAD; QUIRK, 2012; RAO et al., 2009) (FIGURA 1).

Essas estruturas também foram implicadas em modelos animais de TEPT, o que facilita a investigação dos sistemas neuroquímicos envolvidos. A metaplasticidade, definida como a mudança no estado fisiológico ou bioquímico dos neurônios ou

sinapses que altera sua capacidade em gerar plasticidade sináptica (ABRAHAM, 2008), foi implicada nesses processos. A exposição a agentes farmacológicos (ADAMEC, 2000a, 2000b) ou ao estresse predatório (ADAMEC; BLUNDELL; BURTON, 2003, 2006; ADAMEC; BLUNDELL; COLLINS, 2002; ADAMEC, 1997; ADAMEC et al., 1998) produz uma sensibilização de longo prazo do comportamento tipo-ansiedade e hiperexcitabilidade em roedores; de forma importante, essas manipulações também induzem metaplasticidade em uma projeção hipocampo-amígdala e em uma projeção amígdala-grísea periaquedutal (ADAMEC; BLUNDELL; COLLINS, 2002; ADAMEC, 2000b), com aumento na fosforilação da proteína CREB em núcleos da amígdala frontotemporal, grísea periaquedutal e núcleo supramamilar do hipotálamo (ADAMEC; BLUNDELL; BURTON, 2003, 2006; ADAMEC; HEBERT; BLUNDELL, 2011; ADAMEC, 2000a). Análises de regressão robusta ou modelagem de equações estruturais sugeriram que a plasticidade nessas regiões é capaz de explicar quase toda a variância dos efeitos comportamentais (ADAMEC; BLUNDELL; BURTON, 2003; ADAMEC; BLUNDELL; COLLINS, 2002; ADAMEC et al., 1998; ADAMEC, 2001), sugerindo papel causal, onde a plasticidade causa modificações no comportamento. De forma importante, receptores glutamatérgicos do tipo NMDA parecem ser cruciais tanto para a metaplasticidade induzida pelo estresse predatório quanto para os efeitos comportamentais sustentados (ADAMEC; BLUNDELL; BURTON, 2005; BLUNDELL; ADAMEC; BURTON, 2005; BLUNDELL; ADAMEC, 2007).

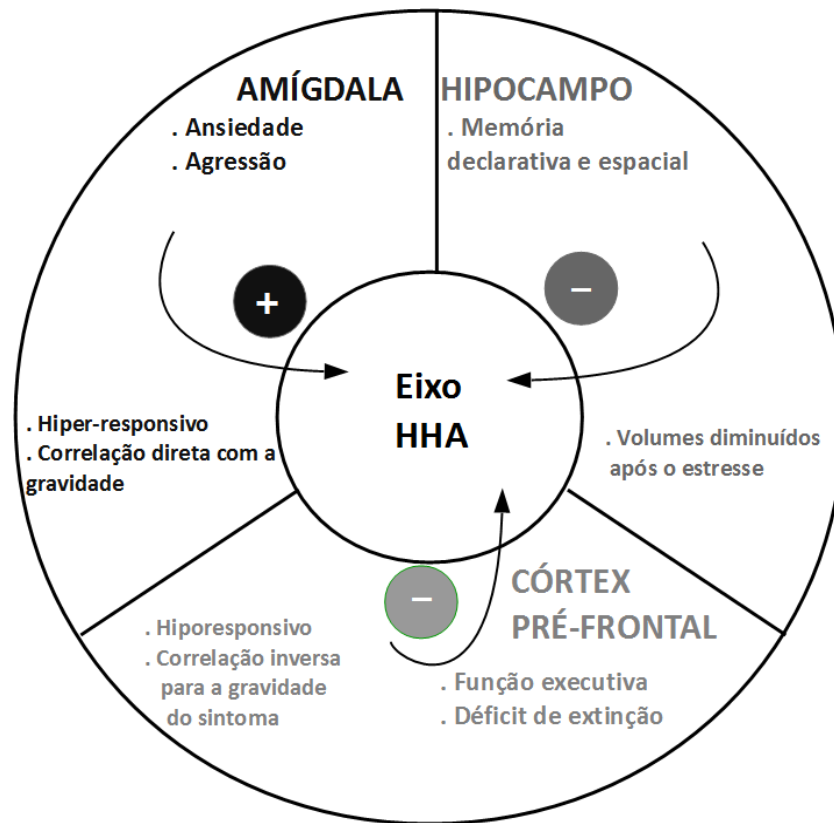


Figura 1: Estruturas do telencéfalo límbico de mamíferos envolvidas no TEPT e que possuem influência direta sobre o eixo HHA. A hiper-responsividade da amígdala contribui para o agravamento de sintomas relacionados com o aumento da ansiedade e comportamento agressivos; as principais alterações encontradas no hipocampo são relacionadas as diminuições estrutural e de atividade, que implicam em déficit na memória declarativa e espacial; a hiporesponsividade do córtex pré-frontal se relaciona inversamente com a gravidade dos sintomas, uma vez que, nessa situação, há prejuízos na função executiva e déficit de extinção do medo (modificado de Rao et al., 2009).

Um possível modelo para esses eventos (RAO et al., 2009) sugere que estressores breves, mas severos, induzem a liberação de GCs que induzirão a liberação intensa de glutamato em regiões límbicas telencefálicas (FIGURA 2). Os GCs também diminuem o tônus GABAérgico sobre essas regiões, desinibindo-as e permitindo que as sinapses excitatórias (glutamatérgicas) iniciem processos de metaplasticidade. Esses mecanismos, uma vez iniciados, podem se manter apesar da restauração dos níveis

normais de GABA, glutamato e GCs após o encerramento do estressor. Esses mecanismos podem ou não envolver a interação entre receptores glicocorticóides e a cascata NMDA-ERK-MSK e a consequente remodelação da cromatina.

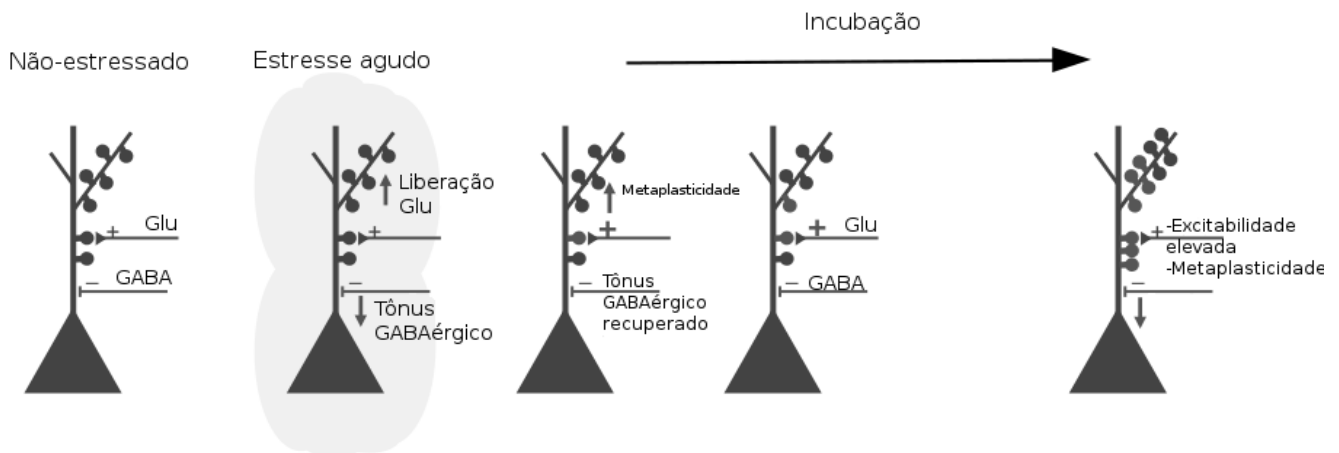


Figura 2: Efeitos imediatos e atrasados de estressores breves e intensos em neurônios principais da amígdala basolateral de roedores. Estressores agudos levam a um surto de cortisol, que promove a liberação de glutamato (nuvem cinza) e uma redução no/ tônus GABAérgico sobre as células principais da amígdala. A excitabilidade elevada resultante inicia processos de metaplasticidade, o que eventualmente leva ao reforçamento atrasado das entradas excitatórias. Esses mecanismos de metaplasticidade, uma vez iniciados, mantém-se ativos apesar da restauração dos níveis normais de inibição, glutamato e cortisol durante a incubação. A excitabilidade elevada e a metaplasticidade resultantes facilitam respostas a estímulos aversivos posteriores. Adaptado de RAO et al. (2009)

1.2. Sensibilização dependente de tempo como modelo animal para o transtorno de estresse pós-traumático

Qualquer estímulo ambiental novo ou ameaçador ativa os sistemas de estresse centrais e periféricos, induzindo mudanças no comportamento que culminam em adaptações a esse estresse, com a função de manter ou restaurar o controle (DE KLOET; JOËLS; HOLSBOER, 2005; HUETHE, 1996). As adaptações induzidas pelo estresse dependem da *controlabilidade* desse estressor (OVERMIER, 2002); assim, estressores controláveis geralmente ativam mecanismos que facilitam a consolidação de um comportamento em curso, e a exposição repetida ao mesmo estressor controlável levará à

habituação da resposta ao estresse neuroendócrino (HERMAN, 2013). Já a exposição a um estressor incontrolável – seja um estressor homotípico (exposição ao mesmo estressor em momentos diferentes), heterotípico (exposição aos estressores diferentes em momentos diferentes) ou crônico – pode levar à intensificação (sensibilização) das respostas comportamentais e neuroendócrinas (HUNZIKER, 2005; MATUSZEWICH et al., 2007). Quando a intensidade é suficientemente elevada, o estressor incontrolável pode sensibilizar respostas a uma grande variedade de estímulos que não estão relacionados com o estressor inicial por um longo período de tempo. Mesmo uma única e breve experiência com o estressor pode levar a essa sensibilização generalizada de respostas a estressores posteriores. Uma variável importante nesses casos é o intervalo de tempo entre as exposições; assim, após um intervalo de “incubação” de dias a semanas, a resposta a estressores posteriores é bastante intensificada – um fenômeno chamado de “sensibilização dependente de tempo” (STAM; BRUIJNZEEL; WIEGANT, 2000; STAM, 2007a).

A sensibilização ao estressor pode ser vista como uma resposta pró-adaptativa, provavelmente correspondendo a uma tentativa final do organismo de facilitar o desenvolvimento de novas estratégias comportamentais (STAM; BRUIJNZEEL; WIEGANT, 2000). Entretanto, quando essa tentativa final não é suficiente para promover adaptação, os mediadores neurais, endócrinos e comportamentais do estresse são ativados de forma frequente e excessiva, gerando uma mal-adaptação que pode resultar em transtornos psiquiátricos importantes – incluindo transtornos de ansiedade, humor, e estresse (STAM, 2007a).

Diferentes estressores homo- e heterotípicos são capazes de produzir sensibilização dependente de tempo, mas alguns parecem ser mais relevantes para a produção de modelos animais de TRTE (DASKALAKIS; YEHUDA; DIAMOND, 2013). Para considerarmos essas mudanças como relevantes para a modelagem do TEPT, é necessário que alguns critérios sejam observados: a) mesmo uma exposição breve ao estressor deverá ser capaz de induzir tanto sequelas comportamentais, quanto fisiológicas do TEPT; b) os efeitos devem ser dose-dependentes e persistir ou aumentar com o tempo; e c) devem produzir variabilidade individual na resposta (YEHUDA; ANTELMAN, 1993).

O modelo de *desamparo aprendido* – o deficit de aprendizagem aversiva produzido pela experiência prévia com um estressor incontrolável (HUNZIKER, 2005; OVERMIER, 2002) – é um exemplo de sensibilização dependente do tempo (STAM; BRUIJNZEEL; WIEGANT, 2000; STAM, 2007a). Classicamente, a exposição a um estímulo aversivo incontrolável produz dificuldade em aprender a relação de controlabilidade em esquemas de esquiva e fuga (LEVINE et al., 1973; MAIER; ALBIN; TESTA, 1973; OVERMIER; LEAF, 1965; OVERMIER; SELIGMAN, 1967; SELIGMAN; MAIER, 1967). Apesar da crítica de que a duração desses efeitos é curta demais para que tenham relevância como modelos de TEPT (YEHUDA; ANTELMAN, 1993), o estabelecimento do desamparo aprendido é muito mais persistente quando a densidade de choques é aumentada (MURISON; OVERMIER, 1998), causando sensibilidade alterada (hipo- ou hiper-responsividade) e uma série de mudanças que envolvem maior comportamento tipo ansiedade, resposta de sobressalto, e deficit de aprendizagem (SERVATIUS; OTTENWELLER; NATELSON, 1995; STEENBERGEN et al., 1990; VAN DIJKEN et al., 1992a, 1992b, 1992c). Esse processo de sensibilização pode ser revertido pelo tratamento com ansiolíticos clássicos, mas o efeito de antidepressivos é menor (VAN DIJKEN et al., 1992c).

A exposição única ou repetida a modelos de confronto social co-específico também produz mudança de longo prazo na responsividade do animal (STAM, 2007a). Nesses modelos, o animal é exposto a um co-específico não-familiar, induzindo confronto social e agressão (MOTTA; CANTERAS, 2015); na maior parte das espécies, hierarquias de dominação-submissão são rapidamente estabelecidas, e mudanças comportamentais, neurais e endócrinas observadas nos animais subordinados são sugestivas de sensibilização dependente de tempo (STAM; BRUIJNZEEL; WIEGANT, 2000; STAM, 2007a). A exemplo desta mudança, observam-se alterações no ritmo circadiano, alterações neurovegetativas, e aumento de comportamento tipo-depressivo em modelos como o nado forçado (MOTTA; CANTERAS, 2015; STAM, 2007a). Essas mudanças são moduladas por variáveis psicossociais, já que são menos evidenciadas quando os animais são acomodados em grupos após sofrer a derrota (RUIS et al., 1999). Tanto os modelos de estresse psicossocial (p. ex., confronto social) quanto o desamparo aprendido foram

propostos como modelos de depressão (HUNZIKER, 2005; KOOLHAAS et al., 1990; MARROW; BRAIN, 1998; MOTTA; CANTERAS, 2015). Assim, podem representar modelos específicos para a comorbidade entre TEPT e transtorno depressivo maior; alternativamente, podem modelar os aspectos de disforia observados no TEPT.

Esses dados evidenciam que os modelos animais de sensibilização dependente do tempo imitam uma série de aspectos-chave de distúrbios de longo prazo que podem acometer humanos sujeitos a situações de vida extrema (STAM, 2007b). Eles apresentam validade de construto (em causar mudanças estáveis e de longo prazo após eventos estressantes breves mas intensos), validade de face (por provocar alterações bidirecionais em múltiplos domínios comportamentais e variabilidade interindividual), e, pelo menos, alguma validade preditiva (na modulação de efeitos de ansiolíticos e antidepressivos sobre os sintomas) (DASKALAKIS; YEHUDA; DIAMOND, 2013; GOSWAMI et al., 2013; STAM, 2007b; YEHUDA; ANTELMAN, 1993).

A sensibilização dependente de tempo apresenta processos de iniciação e consolidação (ADAMEC; FOUGERE; RISBROUGH, 2010; ADAMEC et al., 2007). O primeiro processo envolve os eventos peritraumáticos iniciais; o segundo equivale à “incubação” dos efeitos do estressor. Esses eventos incluem fenômenos neuroquímicos distintos: a iniciação, mas não a consolidação, da sensibilização ao estresse predatório depende de receptores NMDA (BLUNDELL; ADAMEC; BURTON, 2005) e CRF_1 (ADAMEC; FOUGERE; RISBROUGH, 2010); a consolidação, envolve receptores β -adrenérgicos, glicocorticóides e mineralocorticóides (ADAMEC et al., 2007), receptores $5-HT_{1A}$ e $5-HT_2$ (ADAMEC; BARTOSZYK; BURTON, 2004; ADAMEC et al., 2004), CCK_B (ADAMEC; SHALLOW; BUDGELL, 1997) e CRF_1 (ADAMEC; FOUGERE; RISBROUGH, 2010). Essas observações também apontam para uma estratégia de investigação; assim, intervenções farmacológicas realizadas antes do estresse interferem no processo de iniciação, e investigam as funções permissivas do sistema de interesse, enquanto intervenções realizadas após o estresse interferem no processo de consolidação e investigam as funções supressivas ou estimulatórias do sistema de interesse.

1.2.1. Diferenças individuais em resposta à exposição a experiências traumáticas

É importante ressaltar que, enquanto a exposição a experiências traumáticas é necessária para o desenvolvimento do TEPT, o trauma em si não é suficiente para o desenvolvimento desse transtorno, dado que a maioria dos indivíduos expostos a eventos traumáticos não irá desenvolver o TEPT (MILLER; MCEWEN, 2006; YEHUDA; ANTELMAN, 1993; YEHUDA; LEDOUX, 2007). Assim, a probabilidade condicional de desenvolvimento de TEPT após a exposição a um evento traumático varia de 15% a 38%, dependendo da etnia (GABBAY et al., 2004; HINTON; LEWIS-FERNÁNDEZ, 2011).

Essa variabilidade individual é de extrema relevância para a criação e validação de modelos animais de TEPT (YEHUDA; ANTELMAN, 1993; YEHUDA; LEDOUX, 2007). Alguns estudos demonstraram a heterogeneidade das respostas comportamentais e fisiológicas de animais a eventos estressores (ADAMEC et al., 2012; COHEN; ZOHAR, 2004; COHEN et al., 2004, 2012; MATAR; ZOHAR; COHEN, 2013; MITRA; ADAMEC; SAPOLSKY, 2009). COHEN e colaboradores (COHEN; ZOHAR, 2004; COHEN et al., 2004, 2012; MATAR; ZOHAR; COHEN, 2013) propuseram um método para descrever as consequências da exposição a diferentes estressores, permitindo segregar os animais expostos em grupos de acordo com o grau de responsividade ao estressor. Para isso, critérios comportamentais que reflitam os sintomas clínicos devem ser propostos e então complementados pela definição de Critérios Comportamentais de Corte (CCC) que reflitam a severidade da resposta. COHEN E ZOHAR (COHEN; ZOHAR, 2004; COHEN et al., 2004) demonstraram que, após a aplicação de CCCs, cerca de 22% dos animais expostos podem ser classificados como apresentando Resposta Comportamental Extrema (RCE), enquanto cerca de 25% dos animais expostos apresentam Resposta Comportamental Mínima (RCM). Outro critério possível é a determinação de pontos de corte por percentis; por exemplo, o 20º e o 80º percentis foram selecionados para definir animais “afetados” e “resilientes” em dois modelos diferentes (ADAMEC et al., 2012; LEBOW et al., 2012; MITRA; ADAMEC; SAPOLSKY, 2009).

A aplicação de critérios de corte não só é capaz de discriminar respostas comportamentais divergentes, como também revela padrões fisiológicos variáveis. Animais classificados como RCE apresentam alterações em variáveis neuroendócrinas, autonômicas e imunes, enquanto animais classificados como RCM não diferem dos controles não-expostos (MATAR; ZOHAR; COHEN, 2013). Além disso, animais RCE apresentam sub-regulação na expressão de do fator neurotrófico derivado do cérebro e da sinaptofisina no hipocampo, assim como sobre-regulação dos receptores glicocorticóides, em relação a animais classificados como RCM (KOZLOVSKY et al., 2007, 2009). Animais RCE também apresentam alteração na expressão de proteínas associadas aos receptores NMDA, como a densidade pós-sináptica 95 (que ancora a NOS-1 ao receptor NMDA; (KORNAU et al., 1995)) e proteínas da via da proteína cinase ativada por mitógeno (COHEN et al., 2012). Finalmente, animais resilientes apresentam dendritos mais densamente empacotados e mais curtos na amígdala do que animais afetados (ADAMEC et al., 2012; MITRA; ADAMEC; SAPOLSKY, 2009).

1.3. *O sistema nitrérgico*

O óxido nítrico (NO) representa uma exceção aos critérios para determinação do *status* de neurotransmissor de uma dada substância, devido a sua livre difusão pelas membranas celulares e a aparente ausência de enzimas de degradação (GARTHWAITE; BOULTON, 1995; GARTHWAITE, 2008; WANG, 2002). A formação do NO é mediada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (EC 1.14.13.39), que apresenta duas isoformas constitutivas e dependentes de cálcio (NOS-1 e NOS-3) e uma isoforma indutível e independente de cálcio (NOS-2) (GARTHWAITE, 2008). Em modelos animais, mutantes nulos para o gene *nos1* apresentam diminuição da ansiedade e aumento da impulsividade e agressividade (CHIAVEGATTO; NELSON, 2003).

No sistema nervoso central, o estímulo principal para a ativação da NOS-1 é o influxo de cálcio, principalmente, após a ativação do receptor NMDA pelo glutamato, como mostrado, simplificada, na Figura 3 (GARTHWAITE; BOULTON, 1995; GARTHWAITE, 2008). Os níveis de NOS-2 no SNC são baixos, porém podem ser in-

duzidos em astrócitos e microglia após eventos como inflamação, infecção viral ou trauma (BREDT, 1999; CALABRESE et al., 2006), independente da estimulação pelo Ca^{2+} e não bloqueada por antagonistas da calmodulina (BREDT; SNYDER, 1994). O NO normalmente exerce seus efeitos através da ativação da guanilato ciclase solúvel (EC 4.6.1.2), uma metaloproteína que catalisa a conversão de guanosina monofosfato (GMP) em GMP cíclico (GMPc) (GARTHWAITE; BOULTON, 1995; GARTHWAITE, 2008; GUIX et al., 2005). Por sua vez, o GMPc pode ativar diretamente correntes dependentes de nucleotídeos cíclicos, mediadas pelos canais iônicos dependentes de nucleotídeos, ou uma proteína cinase dependente de GMPc (PKG), que fosforila diversos substratos (GARTHWAITE, 2008). Além disso, o NO também pode ativar correntes de potássio dependentes de cálcio (IK_{Vca}) (GARTHWAITE, 2008); interagir com uma série de metaloproteínas associadas ao estresse oxidativo (catalase, cicloxigenase, citocromo oxidase, NADH desidrogenase), diminuindo ou aumentando suas atividades (DAVIS et al., 2001); interagir com radicais tirosina ou cisteína, produzindo nitrotirosinação ou S-nitrosilação de proteínas, respectivamente (GOULD et al., 2013; GUIX et al., 2005); e ativar a ADP-ribosiltransferase, catalisando a ADP-ribosilação de proteínas (SNYDER; JAFFREY; ZAKHARY, 1998).

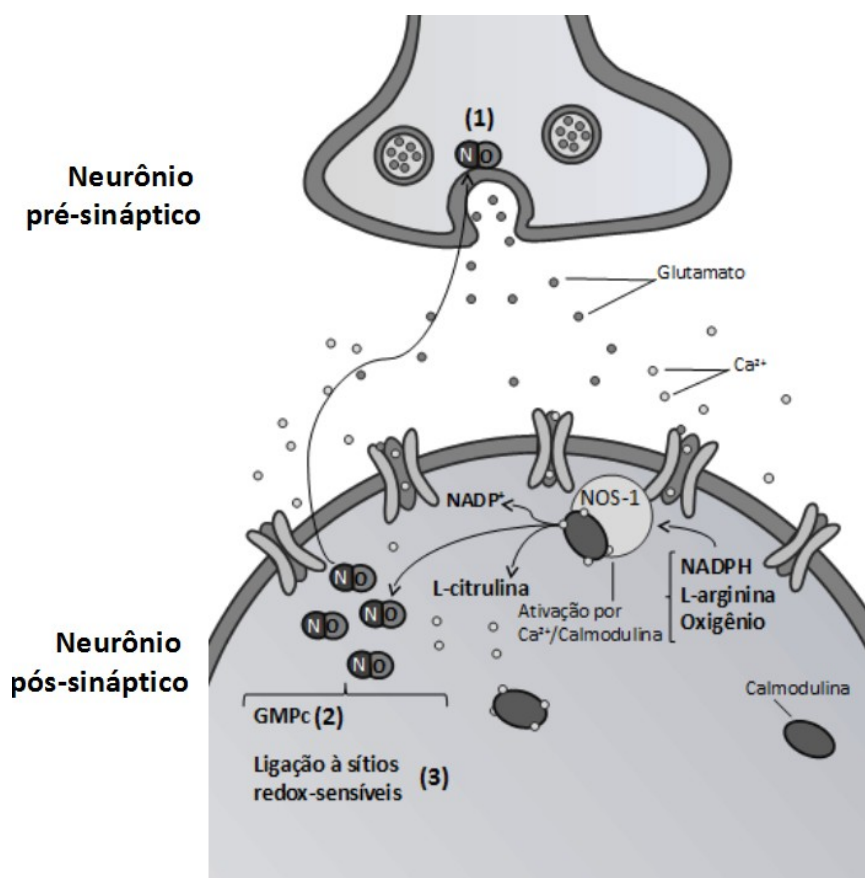


Figura 3: Síntese do NO via NOS-1 e ação desse gasotransmissor em neurônios. O glutamato ativa receptores NMDA no neurônio pós-sináptico, permitindo a entrada de Ca²⁺; esse íon liga-se e ativa a calmodulina, que ativa a NOS-1. Esse último passo catalisa a reação que resulta na formação de NO, NADP⁺ e L-citrulina. O NO difunde-se intra- e inter-celularmente, e pode agir (1) no neurônio pré-sináptico, promovendo a liberação de glutamato; (2) aumentando a concentração intracelular de GMPc; e (3) ligando-se a sítios redox-sensíveis em proteínas. Adaptado de LIMA et al. (2014).

1.3.1. NO e respostas de estresse

Os gasotransmissores – em especial o NO – parecem ter um papel na regulação de respostas neurocomportamentais ao estresse. Nas porções medulares do sistema nervoso autonômico, o NO apresenta ação simpatoinibitória, enquanto no hipotálamo a ação é simpatoexcitatória (PATEL; LI; HIROOKA, 2001). A ativação do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo após estresse agudo depende do NO (LEE; RIVIER, 1998). A exposição ao labirinto em cruz elevado aumenta a atividade de neurônios ni-

trérgicos no PVN e núcleo lateral do hipotálamo (LH), na grisea periaquedutal dorsolateral (dIPAG), e rafe dorsal (DR) (BEIJAMINI; GUIMARÃES, 2006), enquanto a exposição a um predador aumenta atividade de células nitrérgicas nessas mesmas regiões e no hipotálamo pré-mamilar dorsal (PMd), núcleo leito da estria terminal (BNST), e amígdala medial (MeA) (BEIJAMINI et al., 2005). O estresse agudo de contenção aumenta a expressão do mRNA para a NOS-1 na MeA, PVN, e dIPAG (OLIVEIRA et al., 2000), enquanto o estresse crônico aumenta os níveis de nitrito no hipocampo de forma dependente de NOS e NF- κ B (HARVEY et al., 2005), e aumenta a expressão e a atividade da NOS-2 e o estresse nitrosativo no prosencéfalo (OLIVENZA et al., 2000). Parte dos efeitos ansiogênicos do NO é mediada pela dIPAG (FOGAÇA et al., 2012; BEIJAMINI et al., 2005), enquanto que os efeitos ansiolíticos promovidos pelos inibidores da NOS é mediada também pela dIPAG, amígdala basolateral e núcleo septal lateral (CALIXTO et al., 2008). Assim, o papel do NO nas respostas a estressores em modelos animais é variável, e está pouco definido.

A participação do NO nas respostas a estressores é uma sugestão recente, mas a associação da NOS-1 com os receptores NMDA levou à proposição de uma participação em mecanismos de plasticidade neural (GARTHWAITE; BOULTON, 1995; GARTHWAITE, 2008; HOPPER; GARTHWAITE, 2006). O NO age de forma pós-sináptica induzindo depressão de longo prazo de forma dependente da isoforma Ia da PKG, e potenciação de longo-prazo de forma dependente da isoforma II da PKG; um mecanismo pré-sináptico, no qual o NO age como mensageiro retrógrado em resposta à estimulação tetânica, implicou a via GMPc-PKG na formação de *clusters* de proteínas sinápticas, elevando a excitabilidade pré-sináptica ou potencializando sinapses GABAérgicas (GARTHWAITE; BOULTON, 1995; GARTHWAITE, 2008; HOPPER; GARTHWAITE, 2006). O NO também foi implicado no aumento da excitabilidade neuronal intrínseca (i.e., diminuição no limiar para a geração de potenciais de ação e aumento nos disparos espontâneos e induzidos), através de mecanismos dependentes de GMPc e/ou PKG, assim como pela inibição de correntes de potássio de repouso (GARTHWAITE, 2008).

Classicamente, a apresentação de diferentes estressores – da contenção física à exposição a predadores – produz um efeito atrasado sobre comportamentos tipo-ansie-

dade que implica em processos de neuroplasticidade e metaplasticidade. Por exemplo, a exposição ao estresse crônico imprevisível induz aumento no comportamento tipo-ansiedade em roedores em pelo menos 14 dias após o término do estresse (MATUSZEWICH et al., 2007). Da mesma forma, a exposição a um predador produz efeito similar sobre o comportamento tipo-ansiedade (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003), gera um déficit na extinção de medo condicional (GOSWAMI et al., 2010) e altera a capacidade de codificar memórias dependentes do hipocampo (GAIKWAD et al., 2011; PARK et al., 2008). Como discutido anteriormente (Seção 1.1), alguns desses processos parecem estar relacionados com o processo de metaplasticidade em regiões límbicas do prosencéfalo através de um mecanismo dependente de receptores NMDA (ADAMEC; BLUNDELL; BURTON, 2005; BLUNDELL; ADAMEC; BURTON, 2005; BLUNDELL; ADAMEC, 2007). Entretanto, apesar da participação do NO como mediador da plasticidade neuronal associada aos receptores NMDA e com o comportamento defensivo, pouco se sabe sobre seu papel na sensibilização comportamental causada por estressores e as possíveis consequências para a neurobiologia dos transtornos relacionados ao trauma e a estressores.

1.4. O paulistinha como organismo-modelo na psiquiatria biológica

O paulistinha (*Danio rerio*, Hamilton 1822) é um peixe ciprinídeo, pertencente à sub-classe dos teleósteos, oriundo da Índia e sul da Ásia (KEY; DEVINE, 2003) e muito utilizado na prática de aquarismo (SPENCE et al., 2008). Devido ao seu rápido desenvolvimento, fácil manutenção e manipulação, além da elevada produção de ovos, tornou-se um modelo em diversas pesquisas experimentais (SUBBIAH; KAR, 2013), principalmente no campo da genética e biologia do desenvolvimento. Nos últimos anos, essa espécie ganhou visibilidade como modelo comportamental (GERLAI, 2010a; KALLUEFF et al., 2012; NORTON; BALLY-CUIF, 2010; RINKWITZ; MOURRAIN; BECKER, 2011). O paulistinha apresenta um sistema nitrérgico relativamente bem conservado (GIRALDEZ-PEREZ et al., 2008a; HOLMQVIST; EBBESSON; ALM, 2007; HOLMQVIST et al., 2000; VIRGILI et al., 2001) e comportamentos de defesa bem es-

tabelecidos (CACHAT et al., 2011a; GERLAI, 2010b; JESUTHASAN; MATHURU, 2008; JESUTHASAN, 2011; KALUEFF et al., 2012; MAXIMINO et al., 2010a; SUBBIAH; KAR, 2013). Além disso, apresenta linhagens que diferem nos níveis basais de ansiedade (DREW et al., 2012; EGAN et al., 2009; MAXIMINO et al., 2013a; OSWALD; ROBISON, 2011; TRAN; GERLAI, 2013a; VIGNET et al., 2013; WONG et al., 2012), e diferentes estressores produzem alterações importantes em parâmetros comportamentais e fisiológicos (CHAKRAVARTY et al., 2013; CLARK; BOCZEK; EKKER, 2011; ELLIS; SEIBERT; SOANES, 2012; FUZZEN; VAN DER KRAAK; BERNIER, 2010; GAIKWAD et al., 2011; ROSEMBERG et al., 2011). Essas características do paulistinha o transformam em uma espécie com grande potencial traducional para a pesquisa em psiquiatria biológica (BONAN; NORTON, 2015; GERLAI, 2014b; KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014; NORTON; BALLY-CUIF, 2010; NORTON, 2013; STEWART et al., 2014a, 2014c). Considerando as limitações da pesquisa com participantes humanos na identificação de mecanismos, a utilização dessa espécie pode complementar a busca por alvos farmacológicos e mecanismos patológicos associados a domínios específicos.

A responsividade a tratamentos farmacológicos é outro ponto a favor deste modelo experimental, já que os paulistinhas apresentam alta sensibilidade para numerosas intervenções farmacológicas utilizadas no tratamento clínico do TEPT, como antidepressivos e ansiolíticos de primeira linha (CACHAT et al., 2011a; MAXIMINO et al., 2011, 2014c; STEWART et al., 2011a). O paulistinha também apresenta sensibilidade ampla para tratamentos de segunda e terceira linha para o TEPT, incluindo antidepressivos tricíclicos (GUPTA et al., 2014; SACKERMAN et al., 2010; STEWART et al., 2013a), inibidores de monoamina oxidase (IMAO) (RIHEL et al., 2010; STEWART et al., 2011a, 2013a), antipsicóticos atípicos (ELLIS; SOANES, 2012; SEIBT et al., 2010) e anti-epilépticos (BAXENDALE et al., 2012; BURGOS; ALFARO; RIPOLL-GÓMEZ, 2011).

1.4.1 Modelando o transtorno de estresse pós-traumático no paulistinha

Essas características do paulistinha fizeram com que sua utilização na psicopatologia

logia experimental tenha se desenvolvido rapidamente – principalmente nas intersecções com os ramos da genética e farmacologia – tornando este um dos modelos mais promissores para o estudo de doenças neuropsiquiátricas complexas (BONAN; NORTON, 2015; GERLAI, 2014b; KALUEFF; STEWART; GERLAI, 2014; NORTON; BALLY-CUIF, 2010; NORTON, 2013; STEWART et al., 2014a, 2014c). Esses animais possuem uma vasta variedade de fenótipos comportamentais quantificáveis (incluindo comportamentos tipo-ansiedade ou tipo-medo; CACHAT et al., 2011b; CARAMILLO et al., 2015; GERLAI, 2010b, 2013; KALUEFF et al., 2012; MAXIMINO et al., 2010; STEWART et al., 2011) – muitos dos quais são bidirecionalmente sensíveis a uma vasta gama de fármacos indutores e anti-estresse (ARAUJO et al., 2012; MAXIMINO et al., 2014c; STEWART et al., 2011a) – e possuem mecanismos neurais evolutivamente conservados e com alta homologia com roedores e humanos (BROGLIO; SALAS, 2005; DEMSKI, 2013; GANZ et al., 2012, 2014; GOODSON; KINGSBURY, 2013; MAXIMINO et al., 2013b; SALAS et al., 2006). O paulistinha também apresenta diferenças individuais (extroversão-introversão, composição biológica, diferenças de gênero, dentre outras) (SØRENSEN; JOHANSEN; ØVERLI, 2013; TOMS; ECHEVARRIA; JOUANDOT, 2010) que são importantes para a pesquisa de prevenção do TEPT, já que permitem que as nuances do transtorno sejam considerados (YEHUDA; LEDOUX, 2007).

Além dos modelos comportamentais, genéticos e farmacológicos, os ensaios com o paulistinha identificaram inúmeros marcadores, muitos dos quais também são comuns no TEPT humano (CARAMILLO et al., 2014; STEWART et al., 2014b). Proteínas humanas associadas com as respostas inflamatórias, como as interleucinas IL-6, IL-8 e amielóide sérica A, apresentam elevada homologia com paulistinhas (NOVOA; FIGUERAS, 2012; YANG et al., 2014). Há ainda semelhanças funcionais entre o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HPI) de peixes teleósteos com o eixo de HHA humanos, já que ambos apresentam localização de proteínas (ALDERMAN; BERNIER, 2007; ALDERMAN; VIJAYAN, 2011) e respostas de estresse similares (ALSOP; VIJAYAN, 2009, 2011; FUZZEN; VAN DER KRAAK; BERNIER, 2010; GRIFFITHS et al., 2012; SCHAAF et al., 2008; STEENBERGEN; RICHARDSON; CHAMPAGNE, 2011; ZIV et al., 2012): diferentemente da resposta ao estresse de roedores que é baseada na corti-

costerona, no eixo HPI do paulistinha essa resposta é impulsionada pelo cortisol (AL-SOP; VIJAYAN, 2009; ALURU; VIJAYAN, 2009), e a espécie apresenta duas isoformas do receptor glicocorticóide estrutural e funcionalmente semelhantes (SCHAAF et al., 2008), o que não é observado em roedores. Tal semelhança fisiológica com seres humanos faz desse animal excepcionalmente adequado para a investigação de mudanças na regulação de glicocorticóides no estresse e no TEPT (CARAMILLO et al., 2014; STEWART et al., 2014b).

Na proposta de um modelo de TEPT em paulistinhas, faz-se necessária a determinação de respostas comportamentais e neuroendócrinas de estresse como efeitos primários e secundários da exposição a estressores que sejam capazes de sustentar a sensibilização dependente de tempo (CARAMILLO et al., 2014; STEWART et al., 2014b). Felizmente, a última década observou o acúmulo de modelos comportamentais sensíveis ao estresse em diferentes domínios. Iniciaremos levantando algumas das medidas comportamentais e que podem ser úteis para a modelagem do TEPT, para então avançarmos para a descrição de manipulações com potencial para induzir fenótipos similares ao transtorno nessa espécie.

1.4.2. Variáveis dependentes: Respostas comportamentais de estresse

Diversos fenótipos comportamentais (CARAMILLO et al., 2014; STEWART et al., 2014b) e neuroendócrinos (CLARK; BOCZEK; EKKER, 2011; FUZZEN; VAN DER KRAAK; BERNIER, 2010) associados com os domínios alterados no TEPT foram descritos no paulistinha (JESUTHASAN, 2011; MAXIMINO et al., 2010a; STEWART et al., 2011a, 2011b), reforçando a possibilidade de utilização dessa espécie para modelar o transtorno. Atualmente, não há um único protocolo estabelecido especificamente para TEPT que utilize o paulistinha como objeto de estudo, mas muitos modelos que medem e induzem a resposta ao estresse tem sido utilizados para responder outras perguntas (CLARK; BOCZEK; EKKER, 2011; MAXIMINO et al., 2010a). Estas tarefas utilizam uma grande variedade de estímulos e técnicas não apenas para iniciar a resposta em si, mas também para medir vários comportamentos que são indicativos da resposta

ao estresse. Essas tarefas podem não ser capazes de eliciar o TEPT no paulistinha, todavia cada tarefa pode fornecer um potencial lógico e saliente para auxiliar no desenvolvimento de modelos para esse transtorno (CARAMILLO et al., 2014). A Tabela 2 resume alguns dos principais testes utilizados atualmente e sua relevância para a modelagem do TEPT.

Tabela 2: Fenótipos comportamentais do paulistinha e sua relevância para a modelagem dos critérios clínicos e sintomas do TEPT, de acordo com o DSM-5 (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013, KALUEFF et al., 2012). N/A, não se aplica.

Sintoma clínico	Exemplos no paulistinha
A. Exposição a estressores	(Seção 3.3.)
B. Sintomas intrusivos	
Memórias intrusivas recorrentes	Condicionamento de medo, condicionamento de esquiva
Reexperiência traumática (“flashbacks”)	N/A
Pesadelos	N/A
Reações psicológicas às pistas	Medo condicional a pistas
Reações fisiológicas às pistas	Respostas pigmentares, frequência respiratória, cortisol
C. Evitação	
Evitação de memórias e cognições	N/A
Evitação de pistas	Condicionamento de medo, condicionamento de esquiva sinalizada
D. Alterações negativas nas cognições e no medo	
Déficits de memória	Performance alterada em tarefas de memória
Viés negativo recorrente	?
Emoções negativas persistentes	Preferência claro/escuro, distribuição vertical eliciada pela novidade
Interesse reduzido	Respostas apetitivas reduzidas, preferência social reduzida
Isolamento social	Comportamentos sociais reduzidos
E. Excitabilidade e reatividade alteradas	
Irritabilidade	Agressão aumentada
Comportamento auto-destrutivo	?
Hipervigilância	Preferência claro/escuro, distribuição vertical eliciada pela novidade, respostas de orientação
Sobressalto exagerado	Respostas de sobressalto
Problemas de concentração	Alteração na performance em tarefas de atenção
Problemas de sono	Padrões de sono aberrantes

Quando exposto a estímulos que evocam o medo ou a ansiedade, os paulistinhas exibem uma ampla gama de comportamentos bem definidos e quantificáveis, incluindo reduções no comportamento exploratório, aumento na escototaxia (preferência por escuridão), geotaxia (preferência pelo substrato), tigmotaxia (preferência pelas áreas periféricas), congelamento (cessação completa de movimentos, exceto dos opérculos e olhos), e movimentos erráticos (padrão de nado em zigue-zague com direção imprevisível e mudanças rápidas e súbitas de direção) (MAXIMINO et al., 2010a; STEWART et al., 2011a). Estes fenótipos comportamentais são análogos aos de roedores e humanos (KALUEFF et al., 2012). Quando o paulistinha é introduzido em um ambiente novo, apresenta uma tendência em permanecer no fundo do aquário (geotaxia), adotando uma posição de relativa segurança (BENCAN; SLEDGE; LEVIN, 2009; CACHAT et al., 2010; EGAN et al., 2009; LEVIN; BENCAN; CERUTTI, 2007; STEWART et al., 2011a). Essa observação gerou um dos modelos mais utilizados no estudo do comportamento tipo-ansiedade no paulistinha, o teste de *distribuição vertical eliciada pela novidade* (Tabela 3) Essa resposta parecer ser controlada principalmente pela novidade (MAXIMINO et al., 2012), já que, uma vez que se torna habituado ao novo ambiente, ele inicia uma exploração das regiões superiores do aquário (STEWART et al., 2013b; WONG et al., 2010). Assim, a habituação do animal deve ser considerada na avaliação da geotaxia, como discutiremos mais à frente. Além disso, trata-se essencialmente de uma resposta de fuga do topo, já que o animal apresenta preferência pela profundidade, e não pelo substrato e responde com geotaxia a predadores aéreos, mas não a peixes predadores (MAXIMINO et al., 2012).

Um tanto semelhante ao teste de distribuição vertical eliciada pela novidade é o *teste de campo aberto*. Em vez de medir a quantidade de tempo gasto no fundo do aquário como um indicador de estresse, a distribuição horizontal do animal é avaliada – isto é, mede-se o tempo passado na periferia ou no centro de um aquário novo. Quanto mais tempo gasto na periferia do aquário, maior é o aumento da resposta ao estresse (AHMAD; RICHARDSON, 2013; STEWART et al., 2012). A *aproximação a um objeto novo* também é uma tarefa em que a reação à novidade pode ser medida (MAXIMINO et al., 2014a; NORTON et al., 2011; WRIGHT et al., 2003). A lógica por trás de testes

de exploração da novidade – incluindo a distribuição vertical eliciada pela novidade e a exploração de objeto novo – foi proposta por K. C. Montgomery (MONTGOMERY, 1954): a novidade deve eliciar não só a aproximação (“curiosidade”), mas também a evitação (“medo”), e o comportamento exploratório observado é uma função desse conflito motivacional. Assim, em teoria, estados de medo, ansiedade ou estresse elevados devem diminuir a exploração de um objeto ou ambiente novo; no entanto, o efeito dessas manipulações na preferência pelo substrato ou na exploração de objetos novos não é consistente (MAXIMINO et al., 2012).

Além da geotaxia, outros comportamentos também foram observados no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade, e parecem ser diferencialmente sensíveis a tratamentos que aumentam ou diminuem a ansiedade (Tabela 3). Utilizando ferramentas de mineração de dados e análises estatísticas sofisticadas, CACHAT e colaboradores (2011a) observaram que manipulações ansiogênicas (exposição a substância de alarme co-específica, abstinência de morfina, administração de cafeína) tendem a aumentar o congelamento e o nado errático, enquanto manipulações ansiolíticas (tratamentos crônicos com fluoxetina, etanol ou morfina) tendem a diminuir os. Através de análises de *cluster*, o mesmo grupo demonstrou que congelamento e nado errático agrupam-se em um *cluster* diferente da geotaxia (CACHAT et al., 2011a), mas a *habituação* do congelamento agrupa-se com a *habituação* da geotaxia (STEWART et al., 2013b). GERLAI e colegas (AHMED; FERNANDES; GERLAI, 2012; BASS; GERLAI, 2008) demonstraram que a exposição a modelos de predadores simpátricos ou alopátricos não aumenta nem o nado errático, nem o congelamento. O estresse de contenção aumenta o nado errático, mas não a geotaxia (GHISLENI et al., 2012), enquanto o contrário é verdadeiro em relação ao estresse imunológico (KIST et al., 2011). Esses resultados sugerem que o controle do comportamento no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade é multifatorial, ressaltando a necessidade de registrar e analisar essas variáveis na verificação do efeito de estressores.

O teste de preferência por escuridão (escototaxia) é um outro modelo comumente utilizado para avaliar o comportamento tipo-ansiedade no paulistinha (Tabela 3). Consiste na exposição do animal a um aquário dividido horizontalmente em duas meta-

des, uma na cor branca e outra na cor preta, e permite a avaliação da preferência do paulistinha pelas áreas escuras (SERRA; MEDALHA; MATTIOLI, 1999). Esse modelo apresenta bom isomorfismo farmacológico, com drogas ansiolíticas – mas não drogas panicolíticas – diminuindo a escototaxia (MAXIMINO et al., 2011). Assim como a distribuição vertical eliciada pela novidade, medidas comportamentais complementares foram propostas para esse modelo (Tabela 3). Em uma análise de *cluster* hierárquico de efeitos farmacológicos, a latência para entrada no compartimento branco e a avaliação de risco (uma entrada breve ou parcial no compartimento branco) agrupam-se em um *cluster* que tem o nado errático como grupo externo, enquanto o congelamento é o grupo externo desse conjunto maior (MAXIMINO et al., 2014c). Nessa mesma análise, a tigmotaxia (tempo dispendido próximo às paredes do compartimento branco) agrupa-se com a escototaxia (MAXIMINO et al., 2014c). Reforçando a distinção entre congelamento e outros comportamentos no teste de preferência por escuridão é a observação de que os paulistinhas tendem a congelar mais no compartimento preto do que no compartimento branco (BLASER; PEÑALOSA, 2011), ainda que animais que apresentam muita evitação do compartimento branco congelam mais quando confinados nessa porção do aquário do que animais que apresentam pouca evitação (BLASER; CHADWICK; MCGINNIS, 2010). Além disso, o confinamento no compartimento branco não muda a escototaxia, mas diminui o nado errático, a tigmotaxia e o congelamento (MAXIMINO et al., 2010b). Finalmente, diferentemente do teste de distribuição vertical eliciada pela novidade, a escototaxia não habitua, apresentando padrão bifásico em uma sessão de 15 minutos (MAXIMINO, 2011a; MAXIMINO et al., 2010b; STEWART et al., 2011c), sugerindo controle por conflito aproximação-evitação (MAXIMINO et al., 2012).

Tabela 3: Principais medidas observadas no comportamento defensivo do paulistinha, nos testes de preferência pela escuridão e distribuição vertical eliciada pela novidade. N/A, não se aplica.

Teste	Comportament o observado	Código ZBC	Descrição	Variáveis que alteram o comportamento
Preferência por escuridão	Escototaxia	1.137	Preferência pelo compartimento escuro do aquário	Substância de alarme aguda aumenta (MAXIMINO et al., 2014b); drogas ansiolíticas diminuem, ansiogênicas aumentam (ARAUJO et al., 2012; MAXIMINO et al., 2011, 2014c)
	Entradas no compartimento branco	1.54	Analisa a atividade exploratória do animal	Drogas estimulantes aumentam (MAXIMINO et al., 2014c)
	Avaliação de risco	N/A	Orientação cuidadosa do animal na direção de estímulos potencialmente aversivos, na tentativa de investigá-los	Drogas ansiolíticas diminuem, ansiogênicas aumentam (MAXIMINO et al., 2014c)
	Nado errático	1.51	Padrão de nado com ocorrências múltiplas de surtos de alta aceleração em rápida sucessão, nos quais a direção do movimento também muda de maneira aparentemente aleatória	Substância de alarme aguda aumenta (MAXIMINO et al., 2014b)
	Tigmotaxia	1.73	Preferência do animal em permanecer próximo às paredes do aquário	
	Congelamento	1.68	Cessaçã completa dos movimentos emitidos pelo peixe frente a um estímulo aversivo	Substância de alarme aguda aumenta (MAXIMINO et al., 2014b)
Distribuição vertical eliciada pela novidade	Geotaxia	1.46	Preferência pelo substrato do aquário	Substância de alarme e predadores não aumentam (AHMED; FERNANDES; GERLAI, 2012; SPEEDIE; GERLAI, 2008); drogas ansiolíticas e panicolíticas diminuem (STEWART et al., 2011a)
	Nado errático	1.51	Padrão de nado com ocorrências múltiplas de surtos de alta aceleração em rápida sucessão, nos quais a direção do movimento também muda de maneira aparentemente aleatória	
	Congelamento	1.68	Cessaçã completa dos movimentos emitidos pelo peixe frente a um estímulo aversivo	

Além de alterações em estados de medo e/ou ansiedade evidenciadas nos testes de preferência claro/escuro e distribuição vertical eliciada pela novidade, os efeitos cognitivos de estressores podem ser medidos em uma versão adaptada do labirinto em cruz para o paulistinha, explorando desta maneira a memória espacial desse animal (KIM et al., 2010). Neste aparato os animais são treinados para associar não só uma recompensa alimentar com um sinal visual (a cor vermelha apresentada em um determinado braço do labirinto), mas também associar a localização da recompensa alimentar com sinais externos ao aparato (tais como portas, mesas, etc.). A exposição do paulistinha a substância de alarme ou um predador simpátrico (o peixe folha indiano *Nandus nandus*), diminuem significativamente a memória para pistas e a memória espacial, medida pela quantidade de tempo gasto no braço correto do labirinto, bem como o número de entradas feitas no mesmo (GAIKWAD et al., 2011).

A habituação à novidade também é uma variável de avaliação da memória não-associativa, e pode representar um fenômeno independente da preferência pelo substrato em si; por exemplo, animais com maior preferência pelo substrato não diferem na habituação dessa variável, e só há correlação entre essas duas variáveis em animais expostos à SA, mas não a outras manipulações ansiogênicas ou ansiolíticas (STEWART et al., 2013b). A avaliação de geotaxia e nado errático no teste de distribuição eliciada pela novidade revelou um aumento no comportamento exploratório do paulistinha após repetidas exposições ao aquário ou em uma única sessão (WONG et al., 2010); esse último efeito de habituação intra-sessão é diminuído pelo tratamento com substâncias ansiogênicas como cafeína ou pentilenotetrazol (WONG et al., 2010). Assim, a análise da habituação do comportamento exploratório ou da aprendizagem espacial podem representar importantes variáveis relacionadas às disfunções de memória exibidas por pacientes humanos com TEPT (CARAMILLO et al., 2014).

Respostas exageradas de sobressalto são uma característica diagnóstica explícita do TEPT, parte da dimensão de hiperexcitabilidade psíquica (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; CÂMARA FILHO; SOUGEY, 2001; WESTON, 2014).

As respostas de sobressalto são reflexos motores evocados pela exposição súbita a estímulos inesperados e comumente aversivos (GRILLON, 2008). Representa um comportamento evolutivamente conservado que é observado em diferentes espécies, permitindo que um organismo reaja rapidamente iniciando respostas de fuga-ou-luta adaptativas (GRILLON, 2008; PFAFF; MARTIN; FABER, 2012). Em mamíferos, estímulos que eliciam medo ou ansiedade – incluindo a administração de agentes ansiogênicos – potencializam a resposta de sobressalto (DAVIS et al., 2009; GRILLON, 2008), e existem evidências na literatura de que essa potencialização é mediada pelo núcleo central da amígdala quando fásica e pelo núcleo leito da estria terminal quando tônica (DAVIS; SHI, 1999; DAVIS et al., 2009). Em paulistinhas adultos, a SA sensibiliza as respostas de sobressalto, diminuindo a intensidade do estímulo necessário para eliciar a resposta (DUONG, 2012).

Em peixes teleósteos, as respostas de sobressalto são controladas por um conjunto de neurônios gigantes reticuloespinhais (a rede de fuga rombencefálica; EATON; LEE; FOREMAN, 2001; KORN; FABER, 1996, 2005). Essas respostas apresentam habituação à estimulação repetida (CHANIN et al., 2012); em larvas, pelo menos dois processos de habituação intra-sessão são observáveis: uma “habituação rápida”, que persiste por menos de 15 minutos, e uma “habituação de curto prazo”, que persiste por mais de 25 minutos e menos de 1 hora (ROBERTS et al., 2011). O segundo processo é bloqueado pelo tratamento com ácido D-(-)-2-amino-5-fosfopentanóico (D-AP5), um antagonista competitivo do receptor NMDA, enquanto o primeiro processo não é sensível a essa manipulação (ROBERTS et al., 2011); entretanto, o tratamento com cetamina ou MK-801, antagonistas não-competitivos do mesmo receptor, e a 7-cloro-4-hidróxi-3-(3-fenoxi)fenil-2(1*H*)-quinolinona (L-701,324), que bloqueia o sítio glicina_B do receptor NMDA, bloqueia a habituação rápida (ROBERTS et al., 2011; WOLMAN et al., 2011). A memantina, antagonista não-competitivo dependente de voltagem do receptor NMDA, aumenta a responsividade do animal e diminui a habituação de curto prazo (BEST et al., 2008). Finalmente, a cetamina também aumenta a inibição pré-pulso (BURGESS; GRANATO, 2007) – uma forma de integração sensório-motora na qual a resposta de sobressalto é atenuada por um estímulo menos intenso apresentado pouco

antes do estímulo que inicia a resposta. Assim, pelo menos em larvas, a habituação das respostas de sobressalto depende do receptor NMDA.

O paulistinha oferece uma ampla distribuição de comportamentos sociais sensíveis à desregulação (DAHLBOM, 2013; GERLAI, 2014a; OLIVEIRA, 2013), o que é particularmente relevante para os sintomas clínicos observados no TEPT e em outros transtornos relacionados ao trauma e estressores (STEWART et al., 2014b). Na avaliação da interação social, estudos que empregam o paulistinha como modelo usaram algumas medidas de avaliação sobre esse aspecto do comportamento, incluindo respostas de cardumeamento (GREEN et al., 2012; MAHABIR et al., 2013; MILLER; GERLAI, 2007; PIATO et al., 2011a, 2011b), testes de exploração social entre dois animais não-familiarizados (BARBA-ESCOBEDO; GOULD, 2012; ENGESZER; RYAN; PARI-CHY, 2004), e medidas de comportamento social (incluindo agressão) pelo teste de estimulação do espelho (MORETZ; MARTINS; ROBISON, 2007; TELES et al., 2013).

Outra variável dependente em potencial é a sensibilidade a drogas de abuso (STEWART et al., 2014b). O paulistinha tem emergido como modelo para se estudar recompensa e abuso de drogas; tanto a larva quanto o peixe adulto mostram alta sensibilidade a várias drogas de abuso (incluindo etanol), assim como tolerância e sintomas de abstinência (BRENNAN; PARKER, 2012; COLLIER et al., 2014; STEWART et al., 2011d). O etanol é, talvez, a droga mais estudada em paulistinhas, e induz numerosas alterações comportamentais que se assemelham às observadas em roedores e humanos, incluindo propriedades reforçadoras e desenvolvimento de tolerância e abstinência (GERLAI et al., 2000, 2009; TRAN; CHATTERJEE; GERLAI, 2014; TRAN; GERLAI, 2013b), características patognomônicas para o diagnóstico de dependência em pacientes humanos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992). Esses estudos são importantes pois o uso abusivo do álcool é comum em pessoas que sofrem de TEPT, prejudicando ainda mais a empatia, resolução de problemas sociais e a capacidade de interpretar e responder aos sinais sociais (MCFARLANE, 1998).

A incapacidade em extinguir a memória de medo parece ser uma importante característica do TEPT (BLECHERT et al., 2007; JOVANOVIC; NORRHOLM, 2011;

WESSA; FLOR, 2007), aumentando o valor de fenótipos de medo condicional no paulistinha. Nessa espécie, o medo condicional parece se expressar como uma mudança de comportamento de congelamento para nado errático conforme o estímulo neutro ganha propriedades de estímulo condicionado (AGETSUMA et al., 2010); entretanto, nem a persistência dessa resposta condicionada, nem sua extinção foram estudadas nessa espécie (BLASER; VIRA, 2014). Mais estudados são processos operantes de condicionamento de esquiva (AOKI; TSUBOI; OKAMOTO, 2015; BLANK et al., 2009; MANUEL et al., 2014a; VALENTE et al., 2012). Nos procedimentos de esquiva inibitória, uma resposta robusta pode ser estabelecida após uma única tentativa em que o animal tem de se abster de nadar a partir de um compartimento branco (aversivo) para um compartimento escuro (apetitivo) a fim de evitar o recebimento de um choque elétrico (BLANK et al., 2009; MANUEL et al., 2014a). Nesse modelo, a execução da esquiva está correlacionada com os níveis corporais de cortisol, e o aumento da intensidade do choque produz aumento correlato na execução da esquiva assim como na expressão dos receptores glicocorticóide e mineralocorticóide no telencéfalo (MANUEL et al., 2014a, 2014b). Em uma variação do modelo, o animal é colocado no compartimento escuro e retirado quando atravessa para o compartimento claro, com aumento das latências a cada tentativa (DOS SANTOS, 2013); aqui, o tratamento agudo com fluoxetina, imipramina, dietilpropiona e cafeína são dificultam a aquisição da esquiva inibitória, enquanto o diazepam facilita a aquisição (DOS SANTOS, 2013). O estresse crônico imprevisível (MANUEL et al., 2014b; PIATO et al., 2011b), mas não o estresse de contenção agudo (PIATO et al., 2011a), diminuem a aquisição da esquiva inibitória.

A esquiva de duas vias implica na aquisição de uma resposta ativa de evitação de um estímulo aversivo, normalmente condicionada à associação com um estímulo neutro. Nesse sentido, na esquiva de duas vias o animal aprende uma relação entre dois estímulos (estímulo neutro e estímulo aversivo) e entre seu comportamento e a evitação do estímulo aversivo (MAIA, 2010). Paulistinhas treinados para nadar de um compartimento a outro de uma *shuttle-box* podem responder sob controle de um estímulo inicialmente neutro, como uma luz (XU et al., 2007). Tanto a aquisição de esquiva inibitória quanto a aquisição de esquiva de duas vias são dependentes do receptor NMDA, já que

ambos os processos são bloqueados pelo tratamento com MK-801 antes do treinamento (BLANK et al., 2009; NG et al., 2012; XU et al., 2007). Além disso, o tratamento com L-NAME, um inibidor não-seletivo das NOS, imediatamente após o treino produz um déficit de retenção da esQUIVA inibitória (XU et al., 2007). No entanto, o papel do medo na aquisição, retenção e extinção da esQUIVA não está claro, e a utilidade desses procedimentos para a modelagem do TEPT ainda é pequena.

1.4.3. Variáveis independentes: Manipulações que induzem estresse no paulistinha

Conforme analisado anteriormente (Seção 1.2, “Sensibilização dependente de tempo”), diversas manipulações experimentais são capazes de estabelecer a sensibilização dependente de tempo em mamíferos, e algumas delas apresentam validade ecológica na indução de uma síndrome tipo-TEPT nesses animais. Em paulistinhas, vários desses estressores já foram analisados em termos de sua capacidade de produzir alterações endócrinas ou comportamentais, e, ainda que somente um deles tenha sido utilizado explicitamente em uma tentativa de modelar o TEPT, vários apresentam potencial como estímulo traumático para essa espécie.

O estresse crônico imprevisível é um modelo que emprega vários estressores (como estresse de contenção, temperaturas extremas da água, isolamento social, aglomeração, baixos níveis de água, várias mudanças de tanque, e exposição a um predador) em um curto período de tempo (CHAKRAVARTY et al., 2013; MANUEL et al., 2014b; PIATO et al., 2011b). Algumas das respostas obtidas relacionadas ao estresse são bem definidas, como o aumento do tempo gasto no fundo do aquário, exibir aparência de cor pálida, aumento do comportamento de cardume e locomoção diminuída (PIATO et al., 2011b), aumento da escototaxia (CHAKRAVARTY et al., 2013), e déficit na aquisição de esQUIVA inibitória (MANUEL et al., 2014b; PIATO et al., 2011b). Imediatamente após o estresse, os níveis corporais de cortisol estão elevados (MANUEL et al., 2014b; PIATO et al., 2011b), com elevação na expressão do transcripto relacionado à cocaína e anfetamina (*cart*) no telencéfalo (MANUEL et al., 2014b), aumento na expressão de *crf*

e *bdnf* em todo o cérebro (CHAKRAVARTY et al., 2013; PIATO et al., 2011b) e diminuição na expressão do receptor glicocorticóide (PIATO et al., 2011b). Entretanto, em todos esses casos um período de incubação não foi utilizado, o que parece ser necessário para a observação de fenômenos do tipo ansiedade em roedores (MATUSZEWICH et al., 2007).

Em paulistinhas, o estresse social modifica a atividade e/ou expressão de sistemas de neurotransmissão associados com ansiedade e excitabilidade. Animais derrotados em conflito social apresentam maior *turnover* de serotonina e dopamina no teto óptico, enquanto animais vencedores apresentam maior *turnover* dessas monoaminas no telencéfalo e bulbo olfatório (TELES et al., 2013); quando o estresse social perdura até o estabelecimento de hierarquias de dominação-submissão, observou-se maior *turnover* de serotonina no rombencéfalo de animais subordinados (DAHLBOM et al., 2012). No entanto, tanto dominantes quanto subordinados apresentam níveis elevados de cortisol corporal e sobre-expressão dos receptores glicocorticóides no encéfalo após o estabelecimento de hierarquias (PAVLIDIS et al., 2011); nesses casos, inclusive, somente os animais dominantes apresentam sobre-expressão de genes relacionados à excitabilidade, incluindo *th2*, *hcrt* e *hdc* (PAVLIDIS et al., 2011).

As robustas respostas anti-predatórias do paulistinha são bem documentadas, e podem ser eliciadas por estímulos diretos (um predador simpátrico, ou um choque elétrico) e parciais (pistas que remetem ao predador) (GERLAI, 2010b, 2013). A evitação do predador pode ser entendida como uma resposta de medo do animal, importante no estudo do TEPT. Quando exposto a predadores simpátricos (mas não alopátricos) e a modelos de predadores, o animal diminui sua atividade, produz nado errático e “saltos” (AHMED; SEGUIN; GERLAI, 2011; AHMED; FERNANDES; GERLAI, 2012; BASS; GERLAI, 2008; GERLAI; FERNANDES; PEREIRA, 2009; LUCA; GERLAI, 2012). Além disso, o estresse predatório também produz outros efeitos comportamentais e neuroendócrinos não diretamente associados à evitação do predador, incluindo elevação nos níveis corporais de cortisol (BARCELLOS et al., 2007) e deficiências de aprendizagem espacial e de pistas (GAIKWAD et al., 2011).

Em uma tentativa explícita de explorar o efeito estressor da exposição a predadores no paulistinha como modelo de TEPT, STEWART e colaboradores (STEWART et al., 2014b) expuseram pequenos grupos de animais a um predador simpátrico (o peixe-folha *Nandus nandus*) por durações de 24 h e 72 h, e verificaram o tempo que o animal passou no topo do aquário (evitando o contato com o predador) e a frequência de nado errático (padrão de nado em zigue-zague com direção imprevisível e mudanças rápidas e súbitas de direção). Nas duas condições (24h e 72h), os animais expostos ao peixe-folha apresentaram um aumento no tempo que passaram no topo do aquário e no número de episódios de nado errático, mostrando claramente a evitação do animal pelo predador e a elevação de estado tipo medo ou ansiedade. Esses resultados sugerem que, ao contrário de respostas a estressores homotípicos mais amenos em roedores (HERMAN, 2013), as respostas comportamentais do paulistinha a um predador não habituam. Ainda que a utilização de um predador como estímulo estressor aumente a validade ecológica (de construto) do modelo, a duração da exposição não é capaz de modelar uma característica essencial do TEPT: a resposta sensibilizada a estímulos breves, e não somente a estímulos sustentados (GOSWAMI et al., 2013; YEHUDA; ANTELMAN, 1993). Além disso, como não houve intervalo entre a exposição ao estresse predatório e o teste comportamental (i.e., não houve incubação), não é possível definir se houve sensibilização.

Um estímulo parcial de predador bastante utilizado para avaliar o comportamento antipredatório do paulistinha é a substância de alarme (SA), definida por Karl von Frisch (1938) pela sua capacidade em produzir nado errático e aumentar a coesão do cardume em vairões (*Pimephales* sp.). Essa substância é produzida em células epidérmicas especializadas (“club cells”) e liberada quando essas células são danificadas, produzindo um sinal de perigo para os outros membros do cardume (JESUTHASAN; MATHURU, 2008). Trata-se de uma mistura de diversos compostos que retém, em maior ou menor grau, a capacidade de produzir respostas tipo-medo nos animais; incluem-se aqui sulfato de condroitina (DECARVALHO et al., 2013; MATHURU et al., 2012) e compostos nitrogenados (BROWN et al., 2000; DØVING; LASTEIN, 2009). Essas substâncias produzem efeitos comportamentais agudos semelhantes à exposição a predadores simpátricos, incluindo aumento na distância da fonte de estimulação (JESU-

THASAN; MATHURU, 2008), aumento na coesão do cardume (SPEEDIE; GERLAI, 2008) e um padrão de aumento de nado errático (EGAN et al., 2009; MATHURU et al., 2012; SPEEDIE; GERLAI, 2008) seguido de imobilidade (MATHURU et al., 2012). A exposição à SA parece gerar um estado de ansiedade ou medo elevados, já que pode aumentar o comportamento tipo-medo ou tipo-ansiedade nos testes de distribuição vertical eliciada pela novidade (EGAN et al., 2009) e preferência claro/escuro (MANSUR; DOS SANTOS; GOUVEIA JR, 2014; MAXIMINO et al., 2014b) imediatamente após a exposição, aumentar o limiar nociceptivo (LIMA et al., 2012; MAXIMINO, 2011b; MAXIMINO et al., 2014b) e aumentar a responsividade a estímulos visuais (STEPHENSON; PARTRIDGE; WHITLOCK, 2012). A SA também é capaz de diminuir a recuperação de memória espacial (GAIKWAD et al., 2011). De forma importante para a modelagem do TEPT, a SA é capaz de apoiar o condicionamento: SUBOSKI e colegas (HALL; SUBOSKI, 1995; SUBOSKI et al., 1990) demonstraram que estímulos visuais pareados com a SA adquirem as propriedades de controle de estímulos dessa substância, sugerindo um teste pelo qual a dimensão de rememoração do TEPT pode ser modelada.

1.4.4. O telencéfalo límbico do paulistinha

Na maioria dos vertebrados, a parte medial do telencéfalo compreende o maior sistema de coordenação do cérebro, o sistema límbico. No telencéfalo, o principal componente do sistema límbico está localizado em posição medial, incluindo a formação hipocampal, amígdala frontotemporal e áreas paliais relacionadas (BUTLER; HODOS, 2005). Além disso, estruturas subpaliais – gânglios da base, amígdala subpial, área septal – também fazem parte do telencéfalo límbico (MORGANE; GALLER; MOKLER, 2005). Outras estruturas que estão fora do telencéfalo também são consideradas parte do sistema límbico e incluem partes do epitálamo, tálamo e hipotálamo dorsal (BUTLER; HODOS, 2005; MORGANE; GALLER; MOKLER, 2005; O'CONNELL; HOFMANN, 2011).

Em mamíferos, o sistema límbico está envolvido na motivação, aprendizagem, emoção, comportamento sexual, memória e em muitas funções integrativas necessárias

para respostas apropriadas ao estímulo; além disso ele possui um papel fundamental no mapeamento espacial para navegação através do ambiente e em muitas tarefas não espaciais. A formação hipocampal é essencial para a memória de curto prazo, sendo assim a porta de entrada para o armazenamento de novos eventos na memória de longo prazo. Além disso, o sistema límbico interage com outros sistemas principais em todo o cérebro, particularmente o sistema olfativo, outras áreas paliais e subpaliais, e o corpo estriado (MORGANE; GALLER; MOKLER, 2005; NOVEJARQUE; LANUZA, 2008). Tanto os núcleos septais quanto a amígdala recebem entradas diretas do bulbo olfatório, enquanto a formação do hipocampo não recebe entradas diretas. A amígdala também está interligado com o corpo estriado, hipotálamo e isocórtex – incluindo o córtex pré-frontal, estrutura hipoativa em pacientes com TEPT (ETKIN; WAGER, 2007; LIBERZON; MARTIS, 2006; SARTORY et al., 2013).

Os núcleos amigdalóides podem ser divididos em três regiões funcionalmente distintas com origens diferentes no processo de desenvolvimento: a amígdala palial olfativa, a amígdala estriatal, e o complexo claustró-amigdalóide (BUTLER; HODOS, 2005). Em mamíferos, os núcleos frontotemporais (núcleo lateral e núcleo basolateral) fazem parte do complexo claustró-amigdalóide, enquanto a amígdala medial e a amígdala central formam a amígdala estriatal (BUTLER; HODOS, 2005). Os núcleos frontotemporais estão envolvidos na criação de memórias emocionais associativas, enquanto os núcleos da amígdala estriatal formam complexos de saída do sistema amigdalóide de medo (DAVIS; SHI, 1999; LEDOUX, 2012a, 2012b). Os núcleos amigdalóides fronto-temporais retransmitem informações a partir da formação hipocampal para a amígdala estriatal, corpo estriado, hipotálamo e isocórtex diretamente ou através de outras divisões da amígdala. Esses sistemas têm sido implicados na patogênese do TEPT (SHIN; RAUCH; PITMAN, 2006).

O telencéfalo de peixes teleósteos possui, como em mamíferos, uma porção palial e uma porção subpalial, caracterizadas pela presença de neurônios principais glutamatergicos no pálio e GABAérgicos no subpálio (WULLIMANN; MUELLER, 2004; WULLIMANN; RINK, 2002). Diferentemente dos outros vertebrados, no entanto, a porção palial do telencéfalo de teleósteos não passa por um processo de evaginação du-

rante o desenvolvimento, mas por um processo de eversão; dessa forma, as estruturas localizadas medialmente no pálio mamífero adulto devem ser encontradas lateralmente no pálio teleósteo adulto (BRAFOR, 2009). Assim, o pálio lateral de teleósteos é correspondente ao pálio medial de mamíferos. Em linhas gerais (Tabela 4), o pálio medial (ou zona medial do telencéfalo dorsal; Dm) parece ser homólogo às porções frontotemporais da amígdala de mamíferos (GOODSON; KINGSBURY, 2013; MAXIMINO et al., 2013b; O'CONNELL; HOFMANN, 2011), o pálio lateral (ou zona lateral do telencéfalo dorsal; Dl) parece ser homólogo ao hipocampo (GANZ et al., 2014; SALAS et al., 2006), e os pálios posterior (zona caudal do telencéfalo dorsal; Dp) e dorsal (zona dorsal do telencéfalo dorsal; Dd) seriam homólogos ao córtex piriforme e ao isocórtex respectivamente (GANZ et al., 2014; MUELLER et al., 2011). No subpálio, propõem-se que os núcleos supracomissural e pós-comissural correspondam à amígdala estriatal (GANZ et al., 2012; MAXIMINO et al., 2013b), enquanto o núcleo dorsal corresponda ao corpo estriado e o núcleo ventral corresponda à área septal (GANZ et al., 2012; MUELLER; GUO, 2009; MUELLER; WULLIMANN; GUO, 2008a, 2008b). As homologias dos núcleos periféricos do subpálio (núcleos central e lateral e núcleos entopedunculares) são desconhecidas (Tabela 4).

Tabela 4: Homologias entre estruturas do telencéfalo do paulistinha e de mamíferos. A nomenclatura utilizada é aquela encontrada em WULLIMANN et al. (1996). O código de ontologia anatômica utilizada pela ZFIN Model Organism Database (<https://zfin.org/action/ontology/search>) também foi utilizado na tentativa de padronizar referências.

Estrutura no paulistinha		Ontologia anatômica (ZFIN)	Homologia proposta
PÁLIO (Telencéfalo dorsal)	Zona medial do telencéfalo dorsal (Dm)	0000391	Amígdala frontotemporal (MAXIMINO et al., 2013b)
	Zona dorsal do telencéfalo dorsal (Dd)	0000506	Isocórtex (MUELLER et al., 2011)
	Zona lateral do telencéfalo dorsal (Dl)	0000536	Hipocampo (GANZ et al., 2014)
	Zona central do telencéfalo dorsal (Dc)	0000487	?
	Zona caudal do telencéfalo dorsal (Dp)	0000181	Córtex piriforme (MUELLER et al., 2011)
SUBPÁLIO (Telencéfalo ventral)	Núcleo dorsal do telencéfalo ventral (Vd)	0000343	Corpo estriado (GANZ et al., 2012)
	Núcleo ventral do telencéfalo ventral (Vv)	0000456	Área septal (GANZ et al., 2012)
	Núcleo supracomissural do telencéfalo ventral (Vs)	0000689	Amígdala estriatal (MAXIMINO et al.,

		2013b)
Núcleo pós-comissural do telencéfalo ventral (Vp)	0000819	Amígdala estriatal (MAXIMINO et al., 2013b)
Núcleo central do telencéfalo ventral (Vc)	0001668	?
Núcleo lateral do telencéfalo ventral (Vl)	0000176	?
Núcleo entopeduncular dorsal do telencéfalo ventral (ENd)	0000340	?
Núcleo entopeduncular ventral do telencéfalo ventral (ENv)	0000299	?

A participação dos núcleos amigdalóides na aprendizagem emocional têm sido intensamente estudada em roedores (LEDOUX, 2012b). Alguns núcleos amigdalóides, incluindo o núcleo basolateral, são centrais para a aprendizagem de esquiva ativa (CHOI; CAIN; LEDOUX, 2010; LÁZARO-MUÑOZ; LEDOUX; CAIN, 2011). Nesse procedimento de condicionamento operante, o animal associa uma resposta (normalmente a mudança de compartimento em uma caixa de alternâncias [“shuttlebox”]) com a evitação de uma consequência aversiva, como um choque elétrico, que é sinalizado por um estímulo neutro sonoro ou luminoso. A teoria de dois fatores propõe que, nessa forma de condicionamento, o animal primeiro aprende que o estímulo sinalizador prevê o estímulo aversivo (i.e., condicionamento pavloviano) e então que um comportamento em particular (esquiva) causa a terminação tanto do sinal quanto do estímulo aversivo (condicionamento operante) (MAIA, 2010). Nesse sentido, o medo condicional ao sinal

impulsiona a aprendizagem de uma resposta de evitação.

Em paulistinhas, o Dm, mas não outras regiões telencefálicas, apresenta sobrerregulação da expressão de mRNA para *cfos* (um marcador de atividade neuronal) após exposição ao teste de preferência claro/escuro (LAU et al., 2011; VON TROTHA; VERNIER; BALLY-CUIF, 2014). Em *Carassius auratus* (um ciprinídeo proximoamente relacionado ao paulistinha), lesões do Dm, mas não do Dl, impedem a aprendizagem de esquiva ativa (PORTAVELLA; TORRES; SALAS, 2004; PORTAVELLA; VARGAS, 2005; PORTAVELLA et al., 2002, 2004; VARGAS; LÓPEZ; PORTAVELLA, 2012). A aprendizagem de esquiva ativa também parece depender do eixo glutamato-NO no Dm em *C. auratus*. A microinjeção antes do treino de esquiva de D-AP5, um antagonista do receptor NMDA, bloqueia a aquisição; o mesmo não é observado quando a droga é injetada imediatamente após o treino, sugerindo que o receptor NMDA participa da iniciação da plasticidade neuronal no Dm (XU et al., 2003). A microinjeção de L-N^G-nitroarginina metil éster (L-NAME), um inibidor não-seletivo das três isoformas da NOS (afinidade NOS-1 < NOS-3 < NOS-2), ou 6-(fenilamino)-5,8-quinolinediona (LY-83583), um inibidor da guanilato ciclase solúvel, antes ou depois do treinamento diminuem o desempenho da esquiva no teste (XU et al., 2009), sugerindo uma participação do sistema NO-GMPc na aquisição e consolidação da memória de esquiva ativa.

1.4.5. O sistema nitrérgico do paulistinha

Em peixes teleósteos, diferentes isoformas da NOS foram relatadas por meio de técnicas de genética molecular, caracterização de seus RNAm e expressão de proteínas. Foram identificadas as sequências completas para os genes da NOS-1 e para as duas isoformas do gene da NOS-2 (*nos2a* e *nos2b*), porém até o momento não há relatos da codificação do gene para a NOS-3 nesses animais, bem como em outros peixes teleósteos (HOLMQVIST; EBBESSON; ALM, 2007). A expressão do RNAm da NOS-1 foi observada no cérebro de animais adultos, olhos e em diferentes órgãos de larvas de embriões em desenvolvimento em diferentes espécies de teleósteos (HOLMQVIST; EBBESSON; ALM, 2007; HOLMQVIST et al., 2000), sugerindo uma conservação dessa isoforma

entre os vertebrados, com preservação da estrutura molecular e caráter funcional correspondente. A descrição espacial da expressão de NOS-1 é complementada por experimentos com o peixe dourado *Carassius auratus*; nessa espécie, a proteína NOS-1 é encontrada por todo o encéfalo, com expressão intensa no telencéfalo (GIRALDEZ-PEREZ et al., 2008). Nessa região, a expressão é mais intensa em Dl e Vp, com expressão intermediária em Dm e no núcleo pré-óptico parvocelular (homólogo ao núcleo paraventricular do hipotálamo)(GIRALDEZ-PEREZ et al., 2008b). Essas mesmas regiões apresentam alta atividade de NADPH-diaforase (NAPH-d), um co-fator importante para a atividade da NOS-1 e marcador de atividade dessa enzima (Figura 4) (GIRALDEZ-PEREZ et al., 2008b). No paulistinha, atividade de NAPH-d no telencéfalo está restrita a Dd e Dl (MUELLER et al., 2011).

Técnicas de amplificação por PCR demonstraram a expressão das isoformas da NOS-2 no cérebro, guelras, rins e macrófagos de teleósteos (LAING et al., 1999; MCNEILL; PERRY, 2005; NEUMANN; FAGAN; BELOSEVIC, 1995). A expressão de NOS-2 pode ser fortemente induzida por endotoxinas, como o lipopolissacarídeo (LPS) (LAING et al., 1999; MCNEILL; PERRY, 2005; NEUMANN; FAGAN; BELOSEVIC, 1995) e infecção viral de fibroblastos (LAING et al., 1999; NEUMANN; FAGAN; BELOSEVIC, 1995). Em larvas de paulistinha, expressão de *nos2b* é restrita ao hipotálamo e neurohipófise até 72h pós-fertilização (WANG et al., 2001), enquanto a expressão de *nos2a* parece estar restrita às porções ventrocaudais do encéfalo (LEPILLER et al., 2009; POON; RICHARDSON; KORZH, 2008).

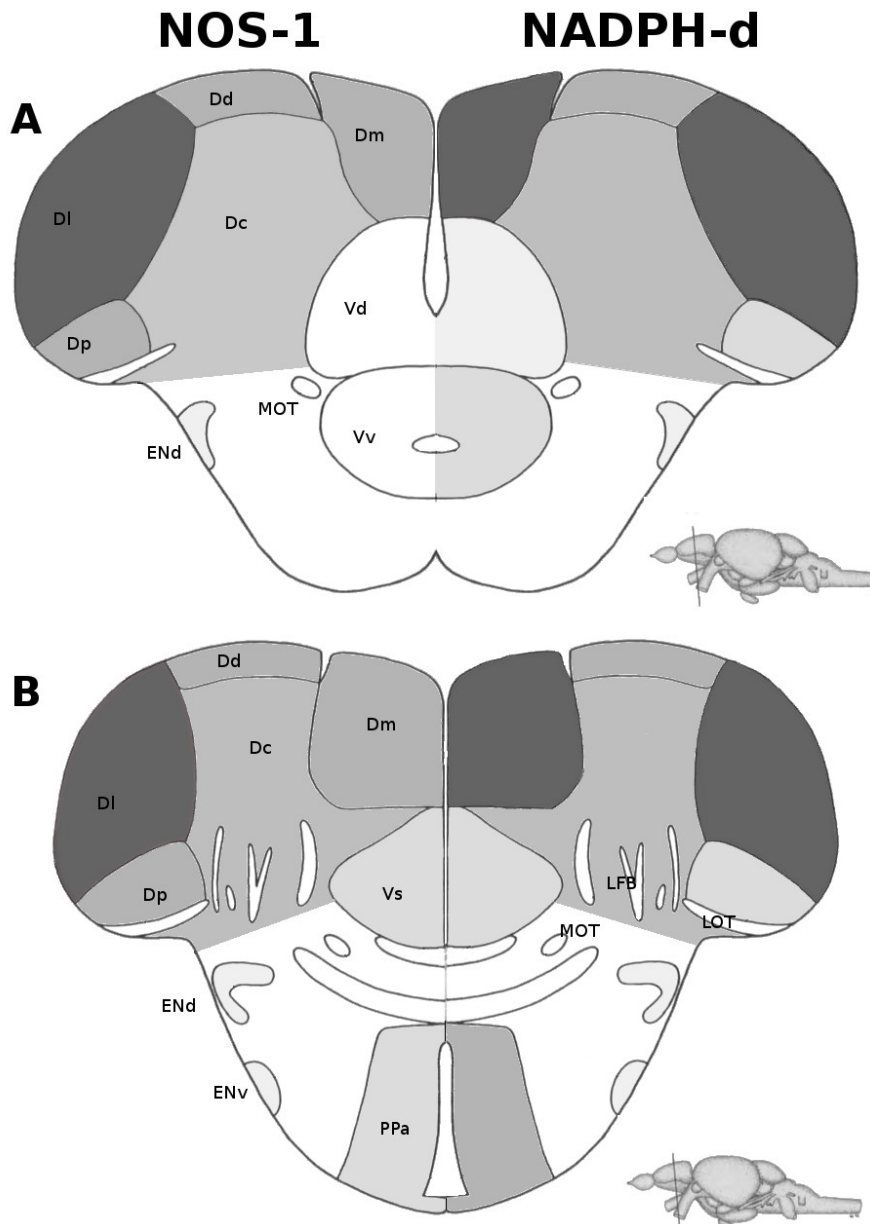


Figura 4: Expressão de NOS-1 (metade esquerda das figuras) e atividade de NADPH-diaforase no telencéfalo de teleósteos, em posição pré-comissural (A) e na altura da comissura anterior (B). O nível de cinza representa a expressão ou atividade relativa da enzima, compilada de HOLMQVIST et al. (HOLMQVIST et al., 2000) e GIRÁLDEZ-PÉREZ et al. (GIRALDEZ-PEREZ et al., 2008b). Os encartes representam a altura das seções em A e B, retiradas de WULLIMANN et al. (WULLIMANN; RUPP; REICHERT, 1996). As homologias descritas ou propostas para as regiões constantes na figura podem ser encontradas na TABELA 2.

CARVALHO (DE CARVALHO, 2014) tratou paulistinhas adultos com cafeína (100 mg/kg) e L-NAME (10 mg/kg) e demonstrou que o inibidor da NOS bloqueia os efeitos da cafeína sobre a escototaxia e congelamento, sem no entanto bloquear os efeitos da droga sobre avaliação de risco, nado errático e tigmotaxia. De forma semelhante, HERCULANO *et al.* (HERCULANO et al., 2015) trataram paulistinhas com NMDA (0,011 mg/kg) e L-NAME (5 mg/kg), e demonstraram que o inibidor bloqueia os efeitos do NMDA sobre a escototaxia, congelamento, tigmotaxia e avaliação de risco. Reforçando o papel do NO na escototaxia, os mesmos autores demonstraram efeito bifásico do nitroprussiato de sódio, um doador de óxido nítrico, na preferência por escuridão: doses menores (1 e 5 mg/kg) diminuem a escototaxia, enquanto doses maiores (10 mg/kg) aumentam essa preferência (HERCULANO et al., 2015). Esses resultados sugerem que o NO participa em respostas de ansiedade, medo e estresse no paulistinha de forma relativamente complexa, inclusive como efector montante da ativação de receptores NMDA.

2. Justificativa

O paulistinha tem emergido como um modelo útil para o estudo de funções genéticas, neurofarmacológicas e comportamentais. A sua utilização possibilita uma série de vantagens, tais como o baixo custo de aquisição e manutenção, facilidade de manuseio e acomodação, curto tempo de vida e facilidade de reprodução em laboratório. O paulistinha também representa um bom modelo de estudo sobre ansiedade e estresse, além de possuir grande homologia genética, neural e endócrino com roedores e seres humanos.

A centralidade do sistema nitrérgico na mediação das respostas psicofisiológicas a estressores aponta para o óxido nítrico como importante alvo farmacológico no transtorno de estresse pós-traumático. Considerando-se a alta prevalência dos transtornos de ansiedade e o parco entendimento dos mecanismos patofisiológicos, neuroquímicos e psicológicos associados à sensibilização do comportamento defensivo após a exposição a um estressor agudo intenso, a utilização de modelos animais simples, mas com alta complexidade neurocomportamental – como o paulistinha –, pode abrir importantes avenidas de investigação para o desenvolvimento de fármacos e intervenções comportamentais de forma a mitigar o transtorno de estresse pós-traumático.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a sensibilização dependente de tempo do comportamento do paulistinha em decorrência da exposição à SA e verificar o papel do sistema nitrérgico nesse processo de sensibilização.

3.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- i. Avaliar o efeito atrasado da SA em modelos de ansiedade e excitabilidade no paulistinha;
- ii. Identificar possíveis diferenças populacionais na sensibilização dependente de tempo do comportamento do paulistinha;
- iii. Analisar padrões de diferença entre os indivíduos na sensibilização dependente de tempo;
- iv. Investigar o curso temporal das alterações nas concentrações extracelulares de glutamato e das concentrações teciduais de nitrito/nitrato após exposição à SA;
- v. Explorar o papel das NOS na iniciação e/ou na consolidação da sensibilização dependente de tempo.

4. Hipóteses/questões de pesquisas

Os experimentos que serão realizados neste trabalho visam responder um conjunto de hipóteses, descritas a seguir:

- **Hipótese 1:** A SA deve sensibilizar o comportamento tipo-ansiedade em ambos os testes e aumentar a responsividade a estímulos de sobressalto;
- **Hipótese 2:** Os animais do fenótipo *longfin* serão mais susceptíveis à sensibilização dependente de tempo causada pela SA;
- **Hipótese 3:** A sensibilização dependente de tempo afeta completamente menos de 30% dos animais expostos;
Hipótese auxiliar: Menos de 20% dos animais são minimamente afetados;
- **Hipótese 4:** Os níveis de NO e/ou seus metabólitos só se elevarão depois de 30 minutos após o estresse, e permanecerão elevados até o momento do teste;
Hipótese auxiliar: Os níveis de glutamato estarão elevados logo após o estresse, mas essa elevação não se sustentará pelo período de incubação;
- **Hipótese 5:** A sensibilização dependente de tempo se deve às alterações na função nitrérgica ocorridas no período posterior ao estresse.

5. Métodos

5.1. Métodos gerais

5.1.1. Animais e alojamento

Para todos os experimentos, foram utilizadas populações de paulistinhas, das linhagens *shortfin* e *longfin*, adquiridos de um fornecedor local. Espera-se que a utilização de animais de cruzamentos heterogêneos, como é padrão em criadouros comerciais, produza maior variabilidade genética e diminua os efeitos da deriva genética aleatória, a qual pode levar ao desenvolvimento de características hereditárias únicas (PARRA; ADRIAN; GERLAI, 2009; SPEEDIE; GERLAI, 2008). Assim, espera-se que esses animais melhor representem populações selvagens.

Nos experimentos descritos neste trabalho, os animais foram alojados seguindo recomendações do Canadian Council on Animal Care (2005) e as recomendações mínimas para o alojamento de paulistinhas (LAWRENCE, 2007). Foram utilizados 417 paulistinhas adultos, de ambos os sexos, com aproximadamente 4 meses de vida, adquiridos de fornecedores locais. Os animais foram alojados em aquários de 40L, com densidade máxima de 25 peixes por tanque. Os aquários foram cheios com água mineral à temperatura ambiente (28°C) e um pH de 7,0-8,0, e houve um controle de oxigenação e filtragem da água. Os paulistinhas passaram por um período de aclimação, permanecendo nesses aquários por pelo menos 2 semanas antes de experimentos começarem.

A iluminação ambiente foi fornecida por lâmpadas fluorescentes em um ciclo de 14h de claro por 10 horas de escuro (LD). Todas as manipulações realizadas buscaram a minimização do sofrimento potencial do animal, de acordo com as recomendações do Canadian Council on Animal Care (CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE, 2005), e todos os procedimentos cumpriram com as orientações para o cuidado e uso de animais em pesquisa determinados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (2013). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEPAE), do Instituto de

Ciências Biológicas (da Universidade Federal do Pará), sob decisão 213-14.

5.1.2. Preparação e exposição dos animais à substância de alarme

A substância de alarme (SA) é considerada um estressor natural para o paulistinha, e sinaliza lesão (possivelmente causada por predação) para outros membros do cardume (JESUTHASAN; MATHURU, 2008); dessa forma considera-se que a SA está no domínio dos modelos experimentais de ameaças predatórias, uma vez que o predador está ausente (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2003).

A SA foi obtida conforme descrito por MAXIMINO *et al.* (MAXIMINO *et al.*, 2014b). O animal doador foi primeiramente anestesiado pelo frio e posteriormente decaptado, e o excesso de sangue retirado com um cotonete de algodão absorvente. 15 cortes superficiais foram feitos na epiderme do animal (região medial-ventral), e a região desses cortes será lavada com 10 ml de água destilada; ainda que a concentração exata das substâncias não possa ser determinada, a concentração relativa é equivalente àquela utilizada por SPEEDIE E GERLAI (SPEEDIE; GERLAI, 2008) como sua dose “alta”. 7 ml dessa solução serão reservados para exposição.

Para a exposição à SA, até 6 animais foram separados em um aquário com 1,5L de água mineral (com altura da linha d'água de cerca de 10cm). Nesse recipiente os animais permaneceram aclimatando por cerca de 10 minutos e, após esse tempo, foram adicionados, delicadamente, os 7 ml da solução de SA no aquário com os paulistinhas. Assim, a concentração relativa final de SA é cerca de 56 vezes maior do que a utilizada por SPEEDIE E GERLAI (2008). Como controle negativo, um grupo de animais foi exposto ao mesmo volume de água destilada. Os animais permaneceram expostos por 6 minutos (EGAN *et al.*, 2009), e após esse tempo eles foram imediatamente transferidos para outro aquário. Este novo aquário foi cheio com 4L de água mineral (tendo uma coluna d'água de 10cm de altura) e acomodou grupos de até 6 animais. Os paulistinhas permaneceram nesse ambiente por 24h após a exposição, quando foram então submetidos aos testes comportamentais.

A qualidade da extração da SA foi avaliada por observação de alterações no

cardumeamento (ZBC 1.141) no decorrer da exposição. Durante o período de exposição foram tiradas fotografias a cada 15 segundos com uma *webcam* USB (resolução de 480K pixels), e a distância de Delaunay (GAUTRAIS et al., 2012; MAXIMINO et al., 2014a) entre os animais foi calculada para cada imagem usando a distribuição FIJI do programa ImageJ (SCHINDELIN et al., 2012).

5.2. *Testes comportamentais*

Os animais do Experimento 1 foram expostos individualmente a um de três testes comportamentais (preferência por escuridão, distribuição vertical eliciada pela novidade, e reatividade de sobressalto). Os animais dos Experimentos 2, 3 e 5 foram expostos individualmente ao teste de preferência por escuridão.

Numa tentativa de facilitar as comparações com a literatura comportamental do paulistinha, as medidas comportamentais também foram identificadas por códigos no formato ZBC X.YZ, referindo-se aos termos do glossário proposto no Zebrafish Behavioral Catalog (KALUEFF et al., 2013).

5.2.1. Preferência por escuridão

O teste de preferência por escuridão analisa o comportamento exploratório sob conflito motivacional, estando sob controle de motivações de aproximação e evitação (MAXIMINO et al., 2012). A preferência por escuridão parece ser mediada, em parte, pela via do glutamato-óxido nítrico (BARBOSA JR et al., 2012; HERCULANO et al., 2015).

O protocolo utilizado foi adaptado de MAXIMINO et al. (2010). 24 h após exposição, os paulistinhas eram transferidos individualmente ao compartimento central de um aquário metade preto, metade branco (15 cm x 10 cm x 45 cm, altura x largura x comprimento) por um período de aclimatação de 3 minutos. Passado o período de aclimatação, as portinholas que delimitam esse compartimento central eram removidas e os animais puderam explorar o aparato livremente por 15 minutos. Essa duração é maior

do que a utilizada por STEWART (STEWART et al., 2011c) porque permite a identificação de alterações no padrão bifásico de preferência (MAXIMINO et al., 2010b).

O experimento foi registrado em arquivos de vídeo digital através de uma *webcam* USB (resolução de 480K pixel) para análise posterior. O aparato de teste foi iluminado a partir de cima por uma lâmpada fluorescente que produziu uma média de 556,7 lux acima do aquário. O experimento foi executado sob o ruído branco Gaussiano constante, o que produziu uma média de 64,5 dB acima do tanque.

O registo visual do comportamento foi avaliado apenas no compartimento branco, dada a facilidade na visualização do animal. O compartimento branco foi então virtualmente dividido em 5 retângulos de 4,5 x 10 cm e os vídeos analisados com auxílio do programa X-Plo-Rat 2005 v1.1 (<http://scotty.ffclrp.usp.br>). As seguintes variáveis foram registradas por um observador cego para tratamento:

Tempo no compartimento branco: O tempo passado na porção branca do aquário, em percentual da tentativa; refere-se à escototaxia (ZBC1.137);

Entradas no compartimento branco: O número de entradas que o animal executa no compartimento branco (em toda a sessão) definidas como o cruzamento da linha média pela nadadeira peitoral; refere-se à atividade exploratória (ZBC1.54);

Duração das entradas no compartimento branco: A média da duração do tempo gasto no compartimento branco pela sua entrada;

Avaliação de risco: O número de eventos de avaliação de risco, definidos como entradas rápidas (menor que 1 segundo) no compartimento branco, seguidas de retornos ao compartimento preto, ou como entradas parciais no compartimento branco (i.e., a nadadeira peitoral não cruza a linha média);

Nado errático: O número de eventos de “nado errático”, definidos como múltiplas ocorrências de “surto de alta aceleração em rápida sucessão nos quais a direção do movimento também muda de maneira aparentemente estocástica” (KALUEFF et al., 2013) (ZBC1.51);

Tigmotaxia: A duração proporcional de eventos de tigmotaxia, definidos como o nado executado a uma distância de no máximo 2 cm das paredes do compartimento branco, e registrada em segundos do tempo nessa condição (ZBC1.173);

Congelamento: A duração proporcional de eventos de congelamento, definidos como “cessação completa de movimento (com exceção dos opérculos e olhos) emitidos pelo peixe quando no fundo do aquário” (KALUEFF et al., 2013); registrada em segundos do tempo nessa condição (ZBC1.68).

5.2.2. Distribuição vertical eliciada pela novidade

A SA afeta a geotaxia, frequência e duração de congelamento e nado errático no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade tanto no *shortfin* (EGAN et al., 2009) quanto em uma linha selecionada para o comportamento de congelamento no teste de campo aberto (WONG et al., 2012).

O protocolo para avaliar a geotaxia no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade foi modificado a partir CACHAT et al. (CACHAT et al., 2010). 24 horas após a exposição à SA, os animais eram transferidos para um aquário transparente com dimensões de 15 cm x 25 cm x 20 cm (largura x comprimento x altura). Os animais puderam explorar livremente o novo aquário durante 6 minutos. O aparato de teste foi iluminado a partir de cima por uma lâmpada fluorescente que produziu uma média de 556,7 lux acima do aquário. O experimento foi executado sob o ruído branco Gaussiano constante, o que produziu uma média de 64,5 dB acima do tanque.

Assim que os animais foram transferidos para o aparato, uma *webcam* USB (resolução de 418K pixels) era ativada, gravando os experimentos para análise posterior. A câmera de vídeo filmou o aquário a partir da frente, registrando, assim, distribuição lateral e vertical do animal. As imagens obtidas a partir da gravação eram divididas em grades de 3 x 3 compostas de quadrados de 10 cm². Os arquivos de vídeo foram posteriormente analisados utilizando o programa X-Plo-Rat 2005 (<http://scotty.ffclrp.usp.br>), e as seguintes variáveis serão registradas:

Geotaxia (ZBC 1.46): o tempo gasto no terço superior do tanque;

Quadrados cruzados: o número de quadrados de 10 cm² cruzados pelo animal durante toda a sessão;

Nado errático (ZBC 1.51): frequência de nados erráticos, definidos como um zig-zag de curso rápido e imprevisível de curta duração;

Congelamento (ZBC 1.68): a duração do tempo total de eventos de congelamento, definida como completa cessação dos movimentos, exceto os movimentos dos olhos e dos opérculos;

'Thrashing' (ZBC 1.174): a duração total de acontecimentos de *'thrashing'*, definido como eventos de nado persistente com o uso da nadadeira caudal enquanto o animal está fisicamente em contato com a parede lateral do aquário;

Salto (ZBC 1.41): o número total de vezes em que o animal executa um salto, definido como uma única aceleração rápida em uma direção com o uso do caudal.

5.2.3. Reatividade de sobressalto e habituação

A literatura reporta que hipoxantina 3-N-óxido, um componente da SA de peixes da superordem Ostariophysi (BROWN et al., 2000), aumenta o nado errático e os saltos em paulistinhas (PARRA; ADRIAN; GERLAI, 2009) e diminui o limiar para sobressaltos auditivos em paulistinhas da linhagem TL (DUONG, 2012).

O ensaio que utilizamos para avaliar a reatividade de sobressalto foi uma modificação do realizado por CHANIN et al. (CHANIN et al., 2012). Os paulistinhas eram transferidos do alojamento para um aquário restrito com as dimensões de 30 cm x 50 cm x 24 cm (largura x comprimento x altura). Nesse aquário, os animais passaram por um período de aclimação de 10 minutos antes da apresentação do estímulo, e durante a aclimação e todo o experimento, o aquário foi iluminado a partir de cima, o que produzirá uma iluminância média de 467,3 lux sobre o aquário. O experimento ainda era executado com um ruído branco Gaussiano constante, o que produziu uma

média de 66 dB acima do aquário.

O experimento consistiu em 10 tentativas com um intervalo de 1 minuto entre elas, nas quais um peso de 200 g caía sobre a superfície de apoio do aquário a uma distância de 10 cm do aquário e uma altura de 15 cm (CHANIN et al., 2012). Uma *webcam* USB filmou o aquário a partir de sua lateral. As seguintes variáveis foram analisadas:

Distância percorrida por tentativa: o número de quadrados cruzados após o início do estímulo;

Número de respostas de sobressalto: o número de tentativas nas quais as características de comportamento característico de salto (ZBC 1.41) estão presentes, após a apresentação do estímulo vibracional;

Probabilidade de sobressalto: calculado a partir do número de respostas de sobressalto comparadas com o número total de tentativas;

Tentativas até habituação: definido como o número de tentativas antes de o animal deixar de responder com o salto por pelo menos três tentativas subsequentes;

Inclinação da curva de habituação: as respostas de habituação em peixes são linearmente relacionada com a magnitude da resposta do animal para a apresentação dos primeiros estímulos e o número de tentativas necessários para a habituação (LAMING; SAVAGE, 1980; LAMING, 1987; ROONEY; LAMING, 1988). Para examinar se a capacidade de resposta ou de habituação foi afetada pela exposição à SA uma inclinação da curva de habituação foi avaliada como a razão entre a média da amplitude de resposta (distância percorrida por resposta) para as duas primeiras tentativas dividida pelo número de tentativas até a habituação (LAMING, 1987).

5.3. Análises neuroquímicas

5.3.1. Dissecção do telencéfalo

Os animais foram sacrificados em gelo e transferidos para uma placa de Petri contendo líquido cerebrospinal artificial (NaCl 131 mM, KCl 2 mM, KH_2PO_4 1,25 mM, MgSO_4 2 mM, glicose 10 mM, CaCl_2 2,5 mM, e NaHCO_3 20 mM; VARGAS et al., 2013), onde eram decapitados para dissecção de seus cérebros. Após decapitação, a pele e ossos cranianos foram removidos, expondo o encéfalo. Para evitar danificar os bulbos olfatórios e telencéfalos, a dissecção era iniciada no nível da junção entre a medula espinal e o tronco encefálico, que foi erguido gentilmente com agulha de insulina (1,60 mm x 50 mm), e as raízes ventrais dos nervos cranianos foram seccionadas usando pinças de microdissecção. O encéfalo era então seccionado na altura da habênula, separando o telencéfalo e o bulbo olfatório do resto dos tecidos (Figura 5).

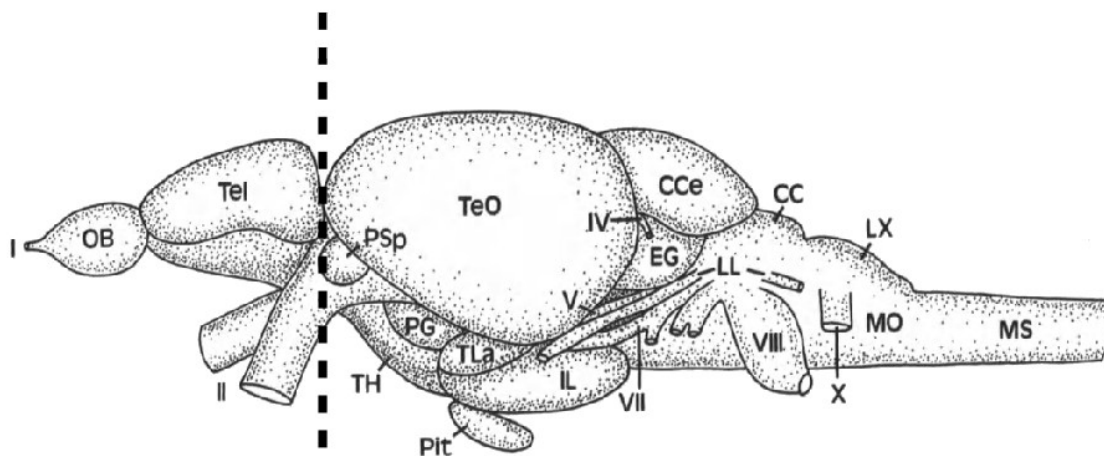


Figura 5: Altura da secção que separou o telencéfalo das estruturas mais caudais durante a dissecção. Para as análises neuroquímicas, somente o telencéfalo e bulbo olfatório serão utilizados. Vista lateral do encéfalo do paulistinha adaptada de WULLIMANN et al. (1996).

5.3.2. Extração do conteúdo extracelular e quantificação de glutamato

A extração do conteúdo extracelular foi realizada através de uma modificação de

método proposto por PRADEL et al. (1999) para a detecção de glicoproteínas no fluido cerebro-espinal do paulistinha. O mesmo método foi utilizado para separar monoaminas no mesmo compartimento no paulistinha (MAXIMINO et al., 2013c). Imediatamente após dissecação, um telencéfalo era incubado em solução de extração (tampão Tris 50 mM, NaCl 90 mM, CaCl₂ 2,5 mM, glutathione 1 mM, pH 7,4) por 30 minutos a 4 °C. A essa solução foram adicionados 20 µl de padrão interno (homosserina, 30 µg/ml; Sigma-Aldrich, H6515) e 20 µl de ácido tricloroacético 1% para precipitação de proteínas, e então o resultado foi centrifugado a 7000 g por 5 minutos a 4 °C. Alíquotas do sobrenadante eram filtradas em filtro de seringa de 0,2 µm e congeladas a -20 °C para análise subsequente. Os precipitados da centrifugação foram dissolvidos em NaOH 0,1 N para análise do conteúdo de proteínas pelo método de Bradford (ZOR; SELINGER, 1996).

A quantificação de glutamato nessas amostras foi realizada utilizando-se um método de cromatografia líquida de alta eficácia (CLAE) previamente utilizado no laboratório para a separação e quantificação de aminoácidos (MORAES et al., 2012). Foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficácia Shimadzu (modelo LC20-AT) composto por bomba, detector de fluorescência (modelo RF-10Axl), degaseificador (modelo DGA20A5), módulo comunicador (modelo CBM20A), sistema de injeção de amostras Rheodyne com alça de injeção de 20 µl, e coluna cromatográfica Shim-Pack VP-ODS (dimensão 250 x 4,6 mm com partículas de 5 µm). As amostras foram injetadas na coluna para separação com auxílio de microseringa de 50 µl (Hamilton).

O método de detecção exige derivatização pré-coluna com um fluoróforo, ortoftaldeído (OPA; Sigma-Aldrich, P0657). Uma solução de OPA (13 mg) e *N*-acetilcisteína (16,3 mg; Sigma-Aldrich, A7250) em metanol 15% era adicionada, junto com tampão borato (pH 9,5), às amostras em proporção de 1:6:4 (v/v). A reação de derivatização, que forma um derivado isoindol fluorescente dos aminoácidos de interesse, foi completada após 5 minutos de incubação.

Após processo de derivatização, as amostras eram injetadas em um sistema de cromatografia reversa com gradiente para eluição da fase móvel composto por duas fases: A (tampão acetato de sódio 50 µM, metanol 5%, 12 ml de propanol para cada litro

de fase A, pH 5,67) e B (metanol 70%) (MORAES et al., 2012). Todos os reagentes utilizados eram grau HPLC. A fase móvel foi composta por 100% fase A no início da análise, 70% fase A e 30% fase B aos 10 minutos, 50% de cada fase aos 20 minutos, e 100% da fase A aos 25 minutos. O fluxo de eluição foi de 1,2 ml/minuto.

Após separação pelo sistema de cromatografia reversa, o padrão interno e o glutamato contido nas amostras foram detectados e quantificados por detector de fluorescência, com comprimento de onda de excitação de 340 nm e emissão de 460 nm. A concentração de glutamato foi calculada a partir da altura do pico respectivo identificado em cromatograma em relação à altura do pico relativo à homosserina. Todas as análises eram feitas no mínimo em triplicata. As concentrações foram corrigidas pelo teor de proteína na amostra, quantificada pelo método de Bradford (ZOR; SELINGER, 1996). O protocolo de separação, detecção e quantificação se encontra resumido na Tabela 5.

Tabela 5: Resumos das condições analíticas para a quantificação de glutamato por CLAE.

Características do protocolo	Especificações
Fase móvel	Fase A (Tampão acetato de sódio, metanol e propanol) Fase B (Metanol 70%)
Coluna analítica	Shimadzu Shim-pack VP-ODS 4.6*250LC, diâmetro interno 4,6 mm
Fluxo	1,2 ml/minuto
Temperatura	26 °C
Agente derivatizante	Ortoftaldeído (OPA)
Controle interno	Homosserina (30 µg/ml)
Método de detecção	Fluorescência (Exc 340 nm, Em 460 nm)
Tempo de eluição	25 minutos
Limite de detecção (glutamato)	0,025 µg/ml (coeficiente de variação 27%)

Limite de quantificação (glutamato) 0,1 µg/ml (coeficiente de variação 7%)

5.3.3. Homogeneização do tecido e quantificação e NO_x^-

A sensibilidade do teste de Griess para NO_x^- é relativamente baixa (HETRICK; SCHOENFISCH, 2009). Dessa forma, para a quantificação dessas espécies no telencéfalo dos animais expostos e não-expostos à SA, um agrupamento de 5 telencéfalos foi utilizado. Os telencéfalos foram rapidamente dissecados conforme descrito acima, e homogeneizados mecanicamente em grupos de 5 em PBS (NaCl 0,8%, KCl 0,02%, K_2HPO_4 0,02 M, pH 7,3; <https://wiki.zfin.org/display/prot/PBS>).

Os níveis teciduais de nitrito e/ou nitrato (NO_x^-) foram determinados através da reação de Griess (GRIESS, 1864), baseada em uma reação de diazotização de dois passos na qual o nitrito acidificado produz um agente nitrosante, que então reage com o ácido sulfanílico para produzir o íon diazônio. Esse íon é então acoplado a *N*-(1-naftil)-etilenodiamina, formando um azo-derivado cromofórico que absorve luz em 540 nm (GRIESS, 1864; HETRICK; SCHOENFISCH, 2009). Para a realização dos ensaios, volumes iguais de amostra e reagente de Griess (ácido fosfórico 5%, *N*-(1-naftil)-etilenodiamina 0,1% e sulfanilamida 1%) foram misturados e incubados no escuro por 10 minutos em temperatura ambiente. A absorbância do produto da reação era mensurada em espectrofotômetro a 540 nm, e a concentração de nitrito em cada amostra será determinada por interpolação em curva-padrão de nitrito de sódio. Os ensaios foram realizados no mínimo em triplicata.

5.3.4. Quantificação de proteínas

Para padronização das análises, as concentrações de glutamato ou NO_x^- obtidas foram normalizadas pela quantidade de proteínas nas amostras, determinadas por uma linearização da análise de Bradford (ZOR; SELINGER, 1996). Sob condições ácidas, o corante Azul Brilhante de Coomassie G-250 doa um elétron livre aos grupos ionizáveis das proteínas, expondo os seus bolsões hidrofóbicos que então irão ligar-se às regiões

não-polares do corante; essa ligação estabiliza o corante em uma coloração azul. A mudança de absorvância pode ser quantificada em espectrofotômetro a 595 nm. Para a análise, às proteínas precipitadas após centrifugação foram adicionados 1M de NaOH e 5 ml do reagente de Bradford (100 mg de Azul Brilhante de Coomassie G-250, 50 ml etanol 95%, 100 ml ácido fosfórico 85% e 850 ml água ultrapura) em uma proporção de 20% (v:v). A solução era agitada para homogeneização e submetida a leitura em espectrofotômetro em 590 nm e em 450 nm (ZOR; SELINGER, 1996); a razão da absorvância das amostras nesses comprimentos de onda foi interpolada em curva-padrão realizada com concentrações decrescentes de albumina bovina.

5.3.4. Critérios para rejeição de *outliers*

Outliers foram checados através da análise do parâmetro Q de Dixon (DEAN; DIXON, 1951):

$$Q = \frac{X_n - X_{n-1}}{X_n - X_1} ,$$

onde x é o valor sob investigação na série ordenada $x_1, x_2, x_3, \dots, x_{n-1}, x_n$; baseando-se em um intervalo de confiança de 95% em torno dessa estatística e um número de 3 observações, valores de Q maiores do que 0,97 foram considerados *outliers* (RORABACHER, 1991) e eliminados da análise.

5.4. *Desenhos experimentais e análise estatística*

As hipóteses de trabalho desenhadas na Seção 3 foram testadas a partir de cinco experimentos comportamentais, farmacológicos e neuroquímicos. Em todos os casos, as análises estatísticas foram realizadas sob mascaramento, com a codificação dos conjuntos de dados por tipo de intervenção.

5.4.1. Experimento 1: Efeito atrasado da SA sobre diferentes tarefas comportamentais em paulistinhas

Os testes de preferência por escuridão e distribuição vertical eliciada pela novidade são os mais utilizados para testar comportamento tipo-ansiedade no paulistinha (MAXIMINO et al., 2010a; STEWART et al., 2011b), e a responsividade (e habituação) a estímulos de sobressalto pode representar uma medida de hiperexcitação psíquica (CHANIN et al., 2012; STEWART et al., 2014b). O Experimento 1 testou a hipótese de que a SA deve sensibilizar o comportamento tipo-ansiedade em ambos os testes e aumentar a responsividade a estímulos de sobressalto. 164 paulistinhas adultos do fenótipo *shortfin* foram utilizados no experimento 1, divididos em 6 grupos de 7 a 12 animais. 3 grupos eram expostos a SA e 3 grupos eram expostos a água destilada, conforme descrito na Seção 4.1.2. 24 horas após a exposição, 1 grupo de cada tratamento foi analisado em cada teste comportamental descrito na Seção 4.2 (Figura 6).

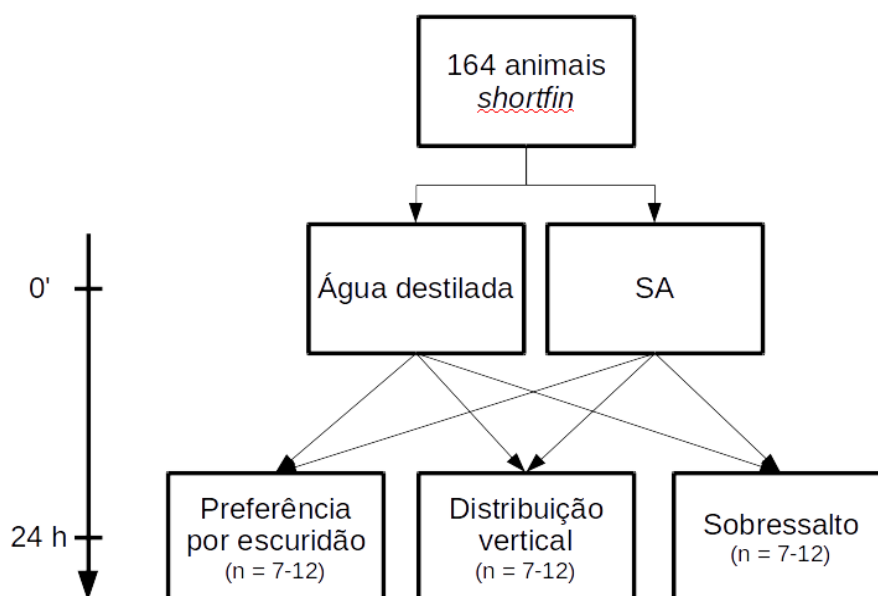


Figura 6: Desenho experimental relativo ao Experimento 1. A seta à esquerda representa o curso temporal do Experimento, com a exposição ao estressor ocorrendo no momento 0' e os testes comportamentais em 24.

Dados paramétricos foram analisados usando-se testes *t* não-pareados, e os dados não-paramétricos foram analisados usando-se o teste U de Mann-Whitney. As

duas variáveis derivadas de mensuração repetida intra-sujeitos (i.e., habituação da geotaxia [distribuição vertical eliciada pela novidade] e distância percorrida por tentativa [reatividade de sobressalto]) foram analisadas utilizando análises de variância (ANOVAs) de medidas repetidas. Diferenças entre grupos foram consideradas significativas quanto $p < 0,05$.

5.4.2. Experimento 2: Comparação da sensibilização dependente de tempo nas linhagens *shortfin* e *longfin*

O fenótipo *longfin* do paulistinha está associado a uma mutação pontual (*lof*) (IOVINE; JOHNSON, 2002), e apresenta maior comportamento agressivo (ITZKOWITZ; IOVINE, 2007) e preferência por substrato/geotaxia (EGAN et al., 2009; KIESEL et al., 2012) em relação ao *shortfin*. O experimento 2 testou a hipótese de que animais desse fenótipo também eram mais susceptíveis à sensibilização dependente de tempo causada pela SA. 18 paulistinhas adultos do fenótipo *shortfin* e 25 animais do fenótipo *longfin* foram utilizados no experimento 2, divididos em 4 grupos de 9 a 13 animais de fenótipo único. 1 grupo de cada fenótipo foi exposto a SA, e 1 grupo foi exposto a água destilada. 24 h após a exposição, os animais foram testados no ensaio de preferência por escuridão (Figura 7). A inexistência de testes estatísticos para mediana em medidas repetidas faz com que seja necessário normalizar os dados ordinais (entradas no compartimento branco, avaliação de risco, nado errático) através da divisão pela mediana. Assim, todas as variáveis (transformadas ou não) foram analisadas utilizando análises de variância 2 (tratamento) x 2 (fenótipo), seguidas de pós-testes de Tukey quando apropriado. P-valores abaixo de 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

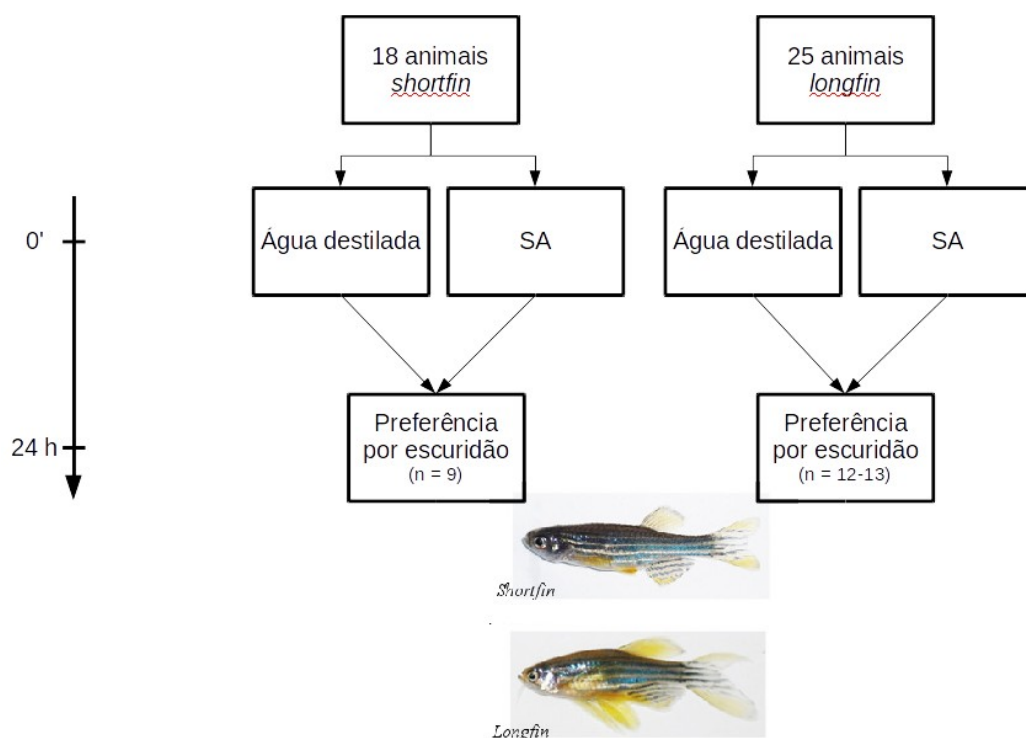


Figura 7: Desenho experimental relativo ao Experimento 2. A seta à esquerda representa o curso temporal do experimento. As fotografias dos fenótipos *longfin* e *shortfin* foram adaptadas de EGAN et al. (2009).

5.4.3. Experimento 3: Aplicação de critérios de corte comportamentais na sensibilização dependente de tempo

A probabilidade condicional de desenvolvimento de TEPT após um evento variam entre 9% e 25% dos casos (KILPATRICK et al., 2013). Essa variabilidade inter-individual é desejável em modelos animais de TEPT, permitindo a identificação posterior de fatores de risco e proteção relacionados a eventos traumáticos (GOSWAMI et al., 2013; YEHUDA; LEDOUX, 2007). O experimento 3 testou a hipótese de que a sensibilização dependente de tempo afeta completamente menos de 30% dos animais expostos; a hipótese auxiliar de que menos de 20% dos animais são minimamente afetados também será testada. Para tal, 60 animais do fenótipo *longfin* foram utilizados, divididos inicialmente em dois grupos por tratamento (SA ou água destilada).

Após verificação dos efeitos gerais da exposição à SA, os dados dos animais expostos eram estratificados de acordo com Critérios Comportamentais de Corte (CCC, Figura 8). Foram utilizadas como variáveis de seleção a tigmotaxia e o tempo no branco, que agrupam-se em termos de efeitos de drogas ansiolíticas e ansiogênicas (MAXIMINO et al., 2014c). Os animais foram classificados como exibindo Resposta Comportamental Extrema (RCE) se passarem menos de 90 segundos no compartimento branco e apresentarem mais de 50% de tigmotaxia nesse compartimento; por outro lado, os animais serão classificados como exibindo Resposta Comportamental Mínima (RCM) se passarem mais de 300 segundos no compartimento branco e apresentarem menos de 30% de tigmotaxia. As “prevalências” de animais alocados *a posteriori* em cada tipo foram analisadas com testes exatos de Fisher. As diferenças nas variáveis comportamentais entre controles não-expostos, animais RCE e animais RCM foram analisadas através de análises de variância de uma via. Em todos os casos, p-valores menores do que 0,05 eram considerados estatisticamente significativos.

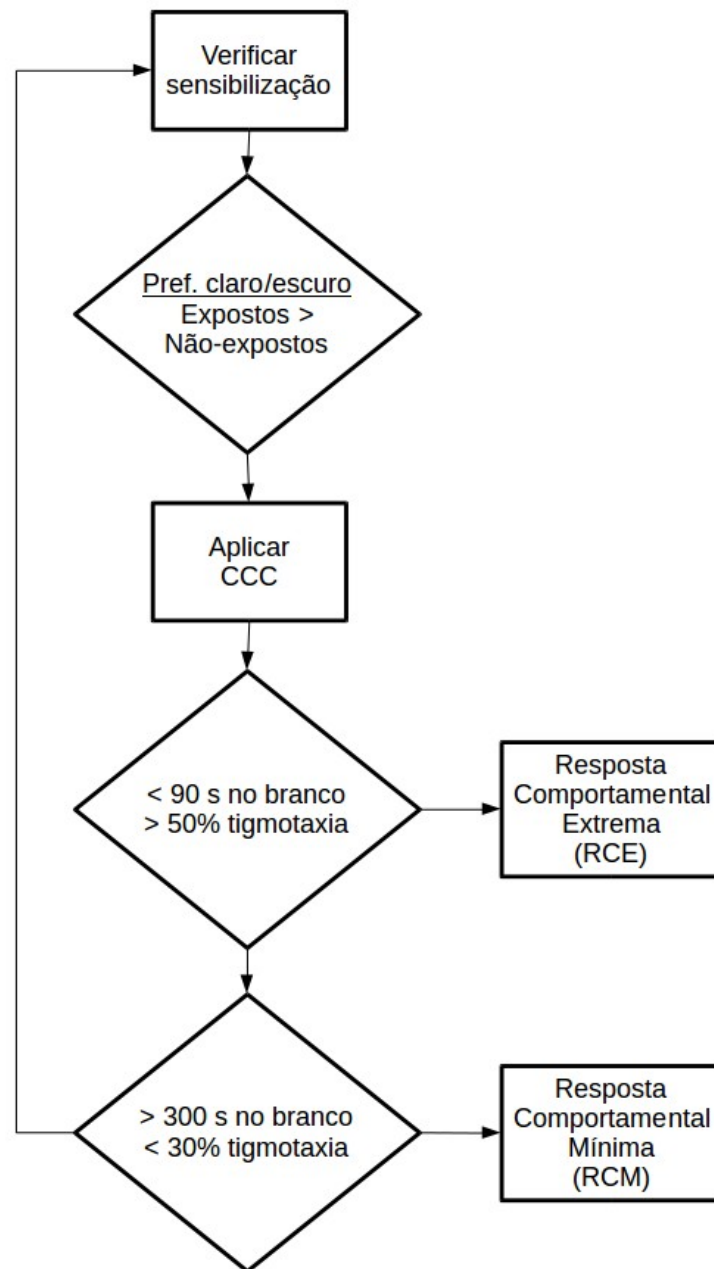


Figura 8: Desenho experimental relativo ao Experimento 3. O fluxograma representa as etapas de aplicação dos Critérios Comportamentais de Corte (CCC), estratificando as amostras em animais exibindo Respostas Comportamentais Extremas (RCE) e Respostas Comportamentais Mínimas (RCM).

5.4.4. Experimento 4: Quantificação de glutamato extracelular e NO_x^- tecidual no telencéfalo após exposição à SA

A possível participação do sistema nitrérgico na sensibilização dependente de tempo pode ser mediada pela liberação de glutamato no telencéfalo após o estresse, ou por elevações sustentadas de NO e/ou de seus metabólitos durante o período que antecede os testes comportamentais. O Experimento 4 testou a hipótese de que os níveis de NO e/ou seus metabólitos só se elevarão depois de 30 minutos após o estresse, e permanecerão elevados até o momento do teste. A hipótese auxiliar de que os níveis de glutamato estarão elevados logo após o estresse, mas que essa elevação não se sustenta pelo período de incubação, também foi testada. Para isso, 182 animais do fenótipo *longfin* foram utilizados. Os animais eram divididos em 2 grupos de exposição (SA e água destilada) e subdivididos em 5 coortes (Figura 9). Cada coorte foi sacrificada em um ponto no tempo após exposição (0 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 90 minutos e 24 h); seus cérebros eram dissecados e processados para as análises neuroquímicas (Seção 4.4). Para as análises de glutamato extracelular, cada unidade experimental foi composta por um único telencéfalo, e os experimentos eram feitos em triplicata. Para as análises de nitrito/nitrato (NO_x^-), cada unidade experimental foi composta por um agrupamento (*pool*) de cinco telencéfalos, e os experimentos foram feitos em triplicata. Os dados foram analisados por análises de variância de duas vias (tratamento X tempo) seguidas de testes de Tukey quando apropriado, com $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

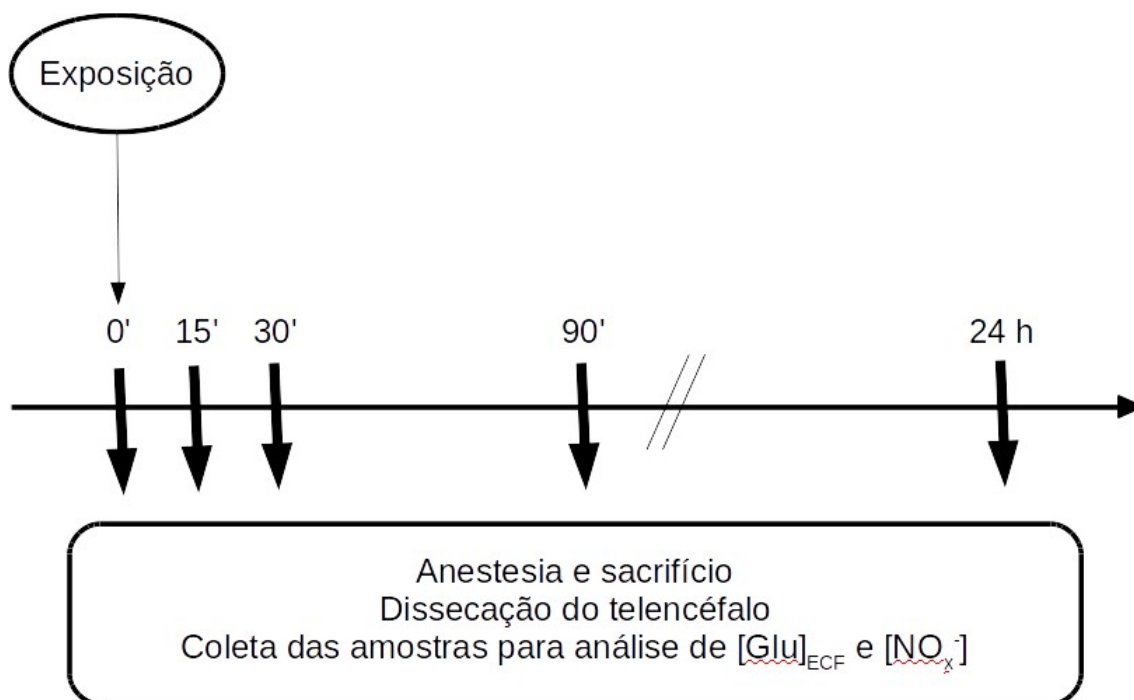


Figura 9: Desenho experimental relativo ao Experimento 4. Os animais serão expostos no tempo 0', e amostras de telencéfalo serão recolhidas nos tempo 0', 15', 30', 90', e 24 h.

5.4.5. Experimento 5: Participação da NOS na iniciação e consolidação da sensibilização dependente de tempo

O papel das NOS na sensibilização dependente de tempo foi testado por pré (iniciação) e pós-tratamentos (consolidação) com L-N^G-Nitroarginina-metil-éster (L-NAME), um inibidor da NOS, em uma dose de 5,0 mg/kg. Essa dose foi escolhida por sua capacidade em bloquear o efeito ansiogênico do NMDA no paulistinha, sendo inefetiva por si só (HERCULANO et al., 2015). Essa droga foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), e dissolvida em solução salina de Cortland (NaCl 124,1 mM, KCl 5,1 mM, Na₂HPO₄ 2,9 mM, MgSO₄ 1,9 mM, CaCl₂ 1,4 mM, NaHCO₃ 11,9 mM, polivinilpirrolidona 4%, 1.000 unidades de heparina, pH 7,4) (WOLF, 1963). Os animais eram anestesiados pelo frio e colocados em uma mesa cirúrgica com base de esponja, permitindo para uma completa imobilização e manutenção da perfusão das guelras; a droga ou o veículo foram injetados intraperitonealmente (KINKEL et al., 2010).

O papel do NO na iniciação da sensibilização dependente de tempo foi analisado através do pré-tratamento com L-NAME 30 minutos antes da exposição ao estressor. O papel do NO na consolidação do processo foi analisado através do pós-tratamento com L-NAME 30 minutos e 90 minutos após a exposição ao estressor. O uso de mais de um intervalo de tempo no estudo da consolidação se deve à existência de isoformas constitutivas e induzíveis da NOS, que produzem NO com cursos temporais e cinéticas diferentes (IZQUIERDO; MEDINA, 1997; IZQUIERDO et al., 2006). Assim a NOS-2, que interage nativamente com a calmodulina e, portanto, independe do estímulo de Ca^{2+} , deve produzir NO contínua, mas atrasadamente, enquanto a NOS-1 produz NO imediatamente após o estímulo e em pulsos breves (GUIX et al., 2005). O experimento foi realizado com controles negativos para cada grupo de tratamento, formando portanto 4 grupos ($n = 6-13$) para cada intervalo de tempo (Figura 10): a) exposição à água e injeção de veículo (CTRL+VEH); b) exposição à água e injeção de droga (CTRL+L-NAME); c) exposição à SA e injeção de veículo (SA+VEH); e d) exposição à SA e injeção de droga (SA+L-NAME).

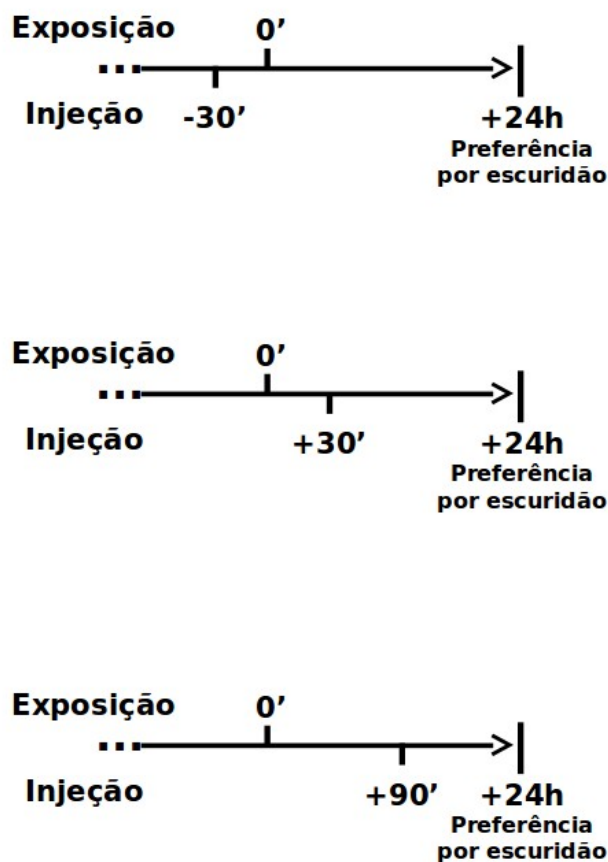


Figura 10: Desenho experimental relativo ao Experimento 5. Cada seta representa a linha temporal de um tratamento. Em todos os casos, os animais são expostos no tempo 0' e passam por teste comportamental no tempo 24 h; variam os momentos de injeção: 30 minutos antes do estresse (-30'), 30 minutos após o estresse (+30'), e 90 minutos após o estresse (+90').

5. Resultados

5.1. Efeitos agudos da exposição à SA

Imediatamente após a exposição à SA, a distância entre os animais diminuiu significativamente ($t_{gl=125} = 5,7958$, $p < 0,0001$; Figura 11A), sem alteração na variância ($t_{gl=125} = 1,408$, NS; Figura 11B), sugerindo efeito ansiogênico da SA e descartando a influência de alterações inespecíficas do comportamento social do animal.

Efeitos agudos da substância de alarme

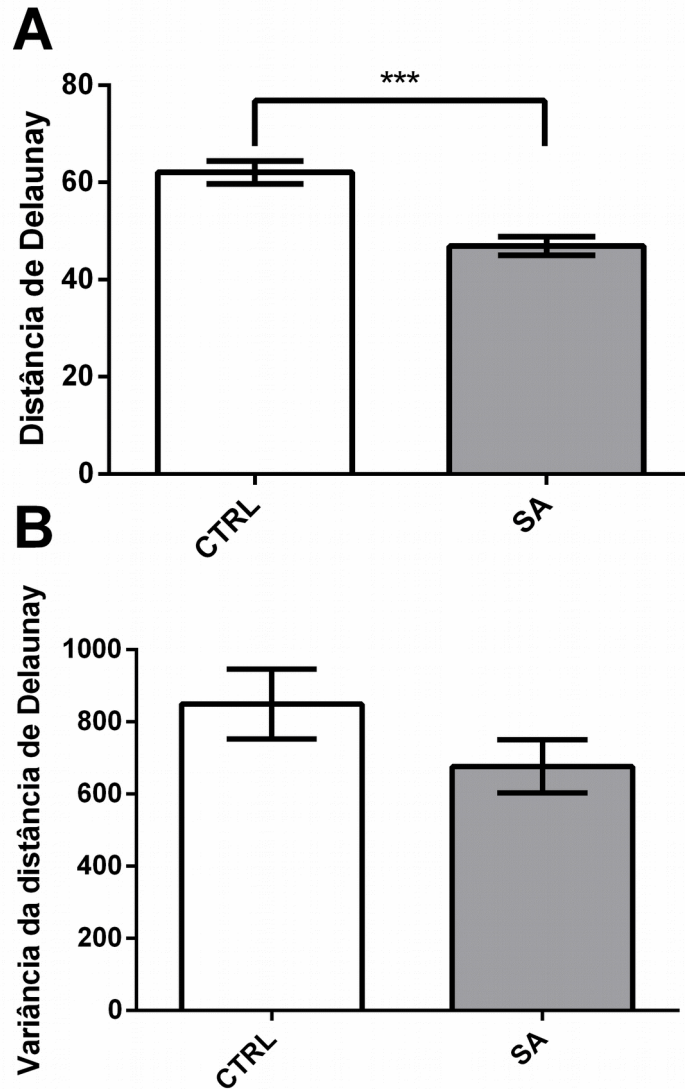


Figura 11: A exposição à SA aumenta rapidamente a coesão do cardume. (A) Distância de Delaunay entre os animais durante os 6 min de exposição. (B) Variância da distância de Delaunay durante os 6 min de exposição. As barras representam média \pm erro-padrão. CTRL, animais não-expostos; SA, animais expostos à substância de alarme. ***, $p < 0,0001$.

5.2. A SA produz sensibilização atrasada da ansiedade e hiperexcitação

A Figura 12 mostra que 24 h após a exposição à SA, os paulistinhas do fenótipo *shortfin* apresentaram um aumento significativo da geotaxia ($t_{gl = 22} = 5,34$, $p < 0,0001$; Figura 12A) e uma habituação diminuída (tratamento – $F_{1,132} = 58,68$, $p < 0,0001$; tempo – $F_{5,132} = 10,30$; interação entre as variáveis: $F_{5,132} = 6,397$, $p < 0,0001$; Figura 12B) no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade. A exposição desses animais à SA também aumentou o nado errático ($U_{gl = 22} = 0$, $p < 0,0001$; Figura 12C) e a frequência de *thrashing* ($U_{gl = 22} = 19$, $p = 0,0014$; Figura 12D), mas não a frequência de saltos ($U_{gl = 22} = 52,5$, NS; Figura 12E) ou de congelamento ($t_{gl = 22} = 0,6332$, NS; Figura 12F).

No teste de preferência pela escuridão, 24 h após a exposição dos animais à SA foi observada diminuição do tempo no compartimento branco ($t_{gl = 13} = -3,407$, $p = 0,0047$; Figura 13A), mas não houve diferenças sobre o número de entradas no compartimento branco ($U_{gl = 13} = 16,5$, NS; Figura 13B) ou sobre a duração da entrada no compartimento branco ($t_{gl = 13} = 1,997$, NS; Figura 13C). A exposição à SA também aumentou a frequência de avaliação de risco ($U_{gl = 13} = 9,5$, $p = 0,0362$; Figura 13D), de nado errático ($U_{gl = 13} = 8,5$, $p = 0,0268$; Figura 14A), e tigmotaxia ($t_{gl = 13} = 2,574$, $p = 0,0231$; Figura 14B). A variável de congelamento não foi significativamente afetada no paulistinha do fenótipo *shortfin* ($t_{gl = 8,862} = 1.154$, NS; Figura 14C).

A Figura 15 mostra os resultados referente ao teste de reatividade de sobressalto, realizado 24h após a exposição à SA. Houve o aumento significativo da distância percorrida na primeira tentativa, mas não sobre as outras tentativas ($F_{9, 180} = 2,012$, $p = 0,0403$ para o efeito da interação; Figura 15A). Além disso, não foram observados efeitos sobre o número de tentativas até habituação ($U_{gl = 20} = 50$, NS; Figura 15B) ou probabilidade de sobressalto ($t_{gl = 20} = 0,1993$, NS; Figura 15C). Finalmente, a exposição à SA aumentou a inclinação da habituação ($t_{gl = 20} = 2,3536$, $p = 0,0289$; Figura 15D).

Experimento 1: Distribuição vertical eliciada pela novidade

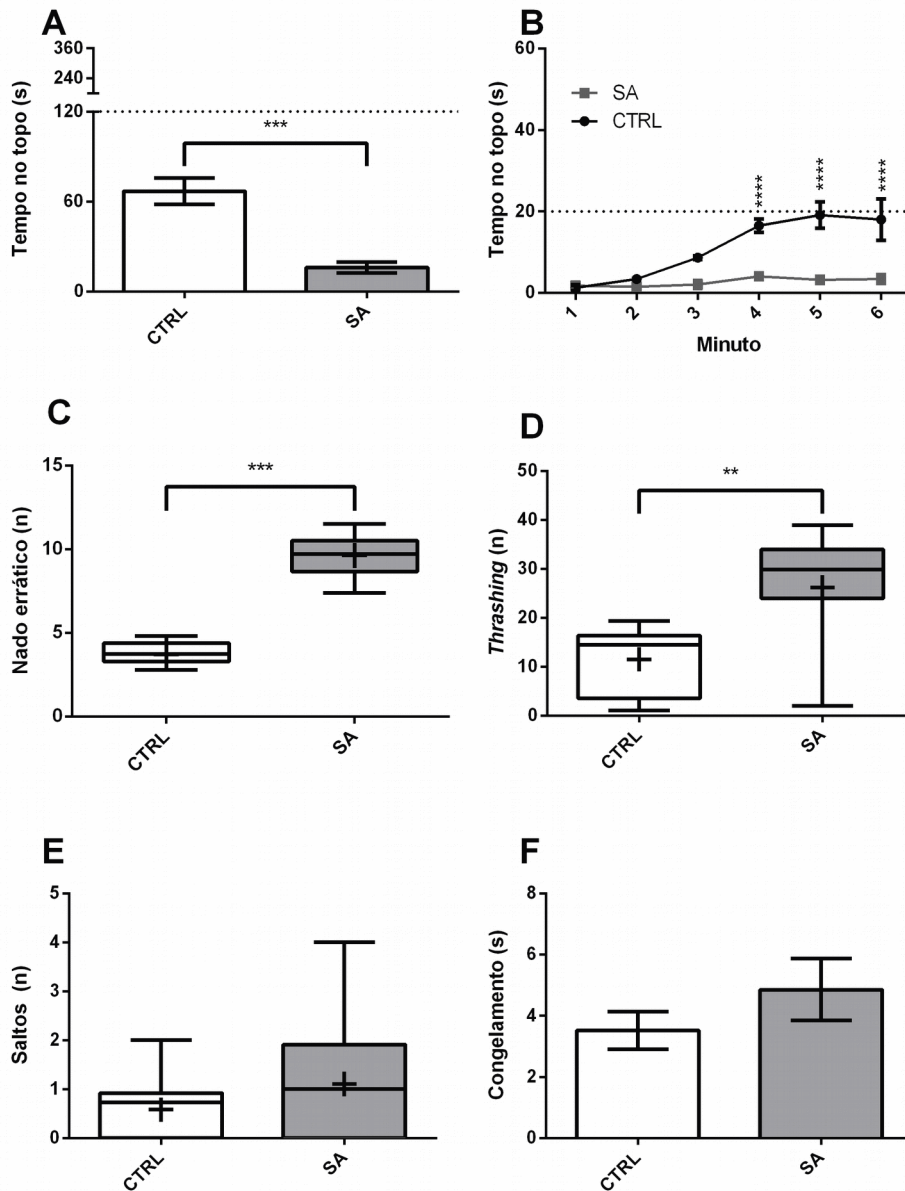


Figura 12: A SA sensibiliza as respostas à novidade de paulistinhas shortfin 24 h após a exposição. (A) Tempo no terço superior do aquário; (B) Habituação da geotaxia; (C) Frequência de nado errático; (D) Frequência de 'thrashing'; (E) Frequência de saltos; (F) Duração do congelamento. As barras representam média \pm erro-padrão, enquanto os 'boxplots' representam dados do 25° ao 75° percentil (caixas) e do valor mínimo ao valor máximo (barras), com o símbolo + indicando a posição da média. CTRL, animais não-expostos (branco); AS, animais expostos à substância de alarme (cinza). ***, $p < 0,0001$; **, $p < 0,001$; *, $p < 0,01$.

Experimento 1: Preferência por escuridão (Parte 1)

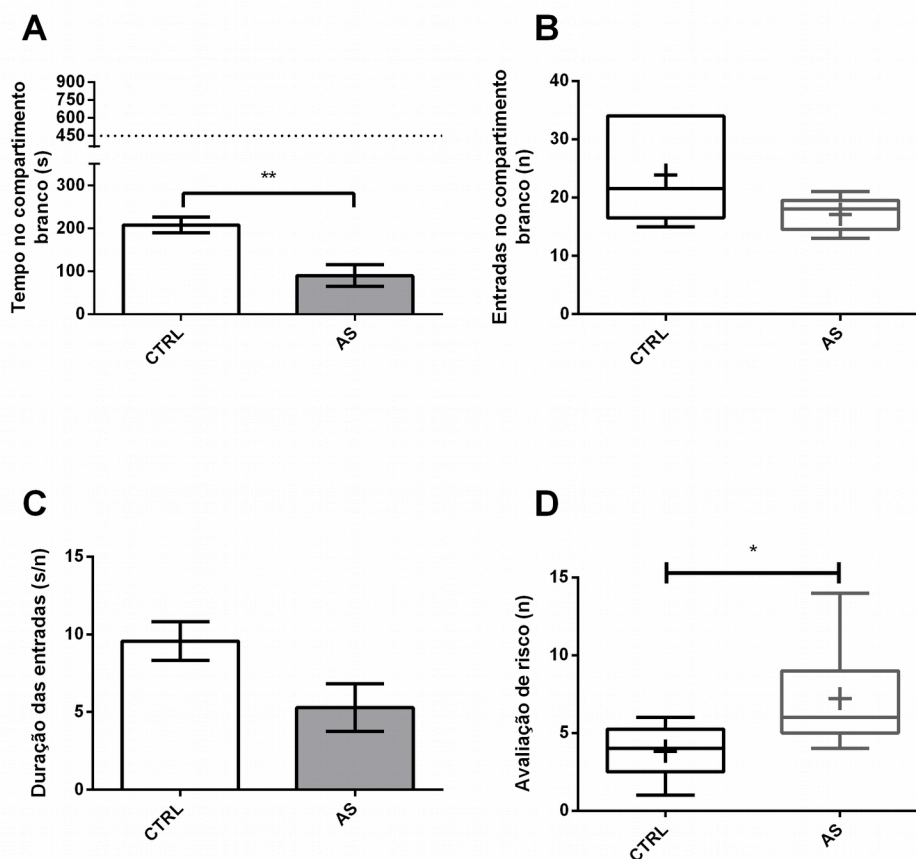


Figura 13: A SA sensibiliza variáveis espaço-temporais de ansiedade no teste de preferência por escuridão 24 h após a exposição em paulistinhas **shortfin**. (A) Tempo no compartimento branco; (B) Entradas no compartimento branco; (C) Duração das entradas no compartimento branco; (D) Frequência de avaliação de risco. As barras representam média \pm erro-padrão, enquanto os boxplots representam dados do 25º ao 75º percentil (caixas) e do valor mínimo ao valor máximo (barras), com o símbolo + indicando a posição da média. CTRL, animais não-expostos (branco); AS, animais expostos à substância de alarme (cinza). **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

Experimento 1: Preferência por escuridão (Parte 2)

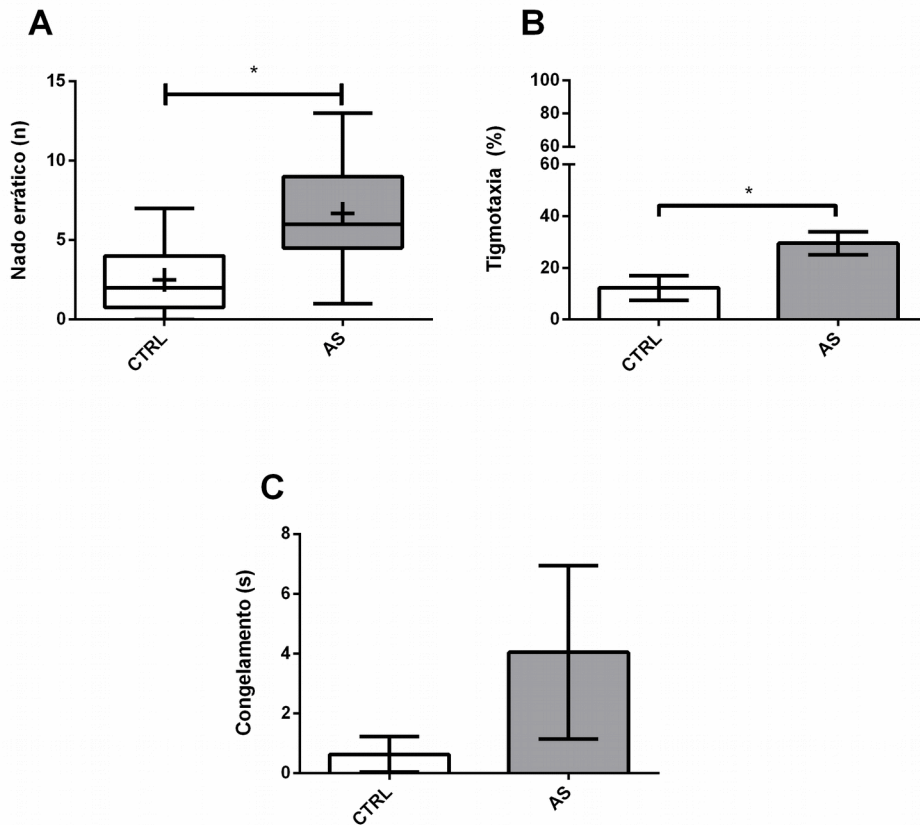


Figura 14: A exposição à SA sensibiliza variáveis etológicas do teste de preferência por escuridão 24 h após a exposição em paulistinhas shortfin. (A) Frequência de nado errático; (B) Tempo em tigmotaxia no compartimento branco; (C) Tempo em congelamento no compartimento branco. As barras representam média \pm erro-padrão, enquanto os boxplots representam dados do 25° ao 75° percentil (caixas) e do valor mínimo ao valor máximo (barras), com o símbolo + indicando a posição da média. CTRL, animais não-expostos (branco); AS, animais expostos à substância de alarme (cinza). *, $p < 0,05$.

Experimento 1: Resposta de sobressalto

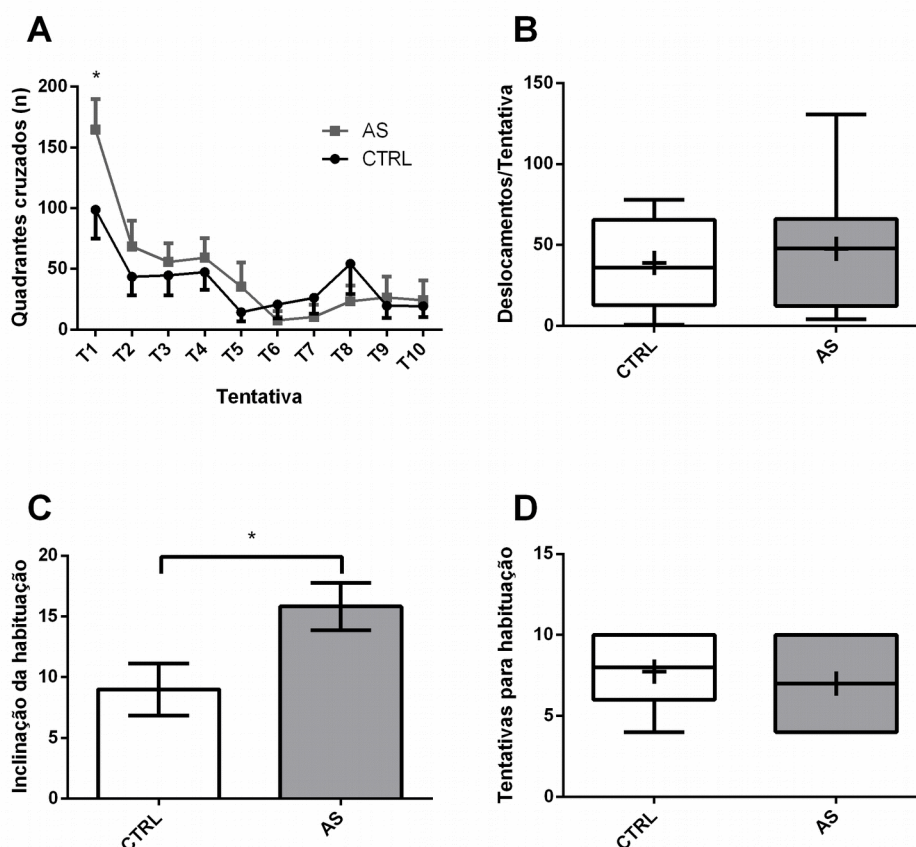


Figura 15: A SA sensibiliza a excitabilidade no teste de sobressalto 24 h após a exposição em paulistinhas shortfin. (A) Número de quadrantes cruzados por tentativa; (B) Média de quadrantes cruzados por tentativa; (C) Inclinação da habituação; (D) Tentativas até habituação. As barras representam média \pm erro-padrão, enquanto os boxplots representam dados do 25° ao 75° percentil (caixas) e do valor mínimo ao valor máximo (barras), com o símbolo + indicando a posição da média. CTRL, animais não-expostos (branco); AS, animais expostos à substância de alarme (cinza). $p < 0,05$.

5.2. A SA sensibiliza mais animais do fenótipo longfin do que animais do fenótipo shortfin

A exposição de animais do fenótipo *longfin* à SA produziu efeito mais intenso sobre o tempo no branco do que em animais do fenótipo *shortfin*, como mostra as

Figuras 16 e 17. Observou-se um efeito do tratamento ($F_{1,39} = 84,06$, $p < 0,0001$) e do fenótipo ($F_{1,39} = 22,54$, $p < 0,0001$), bem como um efeito de interação ($F_{1,39} = 5,818$, $p = 0,0207$) no tempo no compartimento branco (Figura 16A); a análise *post-hoc* revelou diferenças entre os animais expostos à SA e não-expostos à SA do fenótipo *longfin* ($p < 0,0001$), expostos e animais não-expostos do fenótipo *shortfin* ($p < 0,0001$), *longfin* não-expostos e paulistinhas *shortfin* ($p = 0,0027$), e entre *longfin* expostos e animais *shortfin* ($p = 0,0296$). Com relação ao número de entradas no compartimento branco, não houveram diferenças causadas por tratamento ($F_{1,39} = 0,1737$, NS) ou fenótipo ($F_{1,39} = 0,9901$, NS), nem interação entre as variáveis ($F_{1,39} = 0,4572$, NS; Figura 16B).

Efeitos principais do tratamento ($F_{1,39} = 13,58$, $p = 0,0007$) e do fenótipo ($F_{1,39} = 6,65$, $p = 0,0138$), assim como uma interação entre as variáveis ($F_{1,39} = 11,16$, $p = 0,0019$), foram observados em relação à duração das entradas no compartimento branco (Figura 16C). A análise *post-hoc* indicou não haver diferenças entre os animais expostos e não-expostos do fenótipo *shortfin*, enquanto os animais expostos do fenótipo *longfin* tiveram os valores de duração das entradas menores que os animais não-expostos do mesmo fenótipo ($p < 0,0001$); as durações da entrada também foram maiores no *shortfin* não-expostos que nos animais *longfin* não-expostos ($p = 0,0008$).

Na avaliação de risco, foram observados efeitos do tratamento ($F_{1,39} = 62,81$, $p < 0,0001$) e do fenótipo ($F_{1,39} = 33,55$, $p < 0,0001$; Figura 16D), mas a interação entre as variáveis não foi significativa ($F_{1,39} = 4,035$, NS). A análise *post-hoc* revelou aumento da avaliação de risco em paulistinhas *longfin* expostos à SA ($p < 0,0001$) e em paulistinhas *shortfin* ($p = 0,0021$), mas não há diferença entre *longfin* não-expostos e *shortfin* não-expostos ($p = 0,054$).

Experimento 2: Diferenças entre fenótipos (Parte 1)

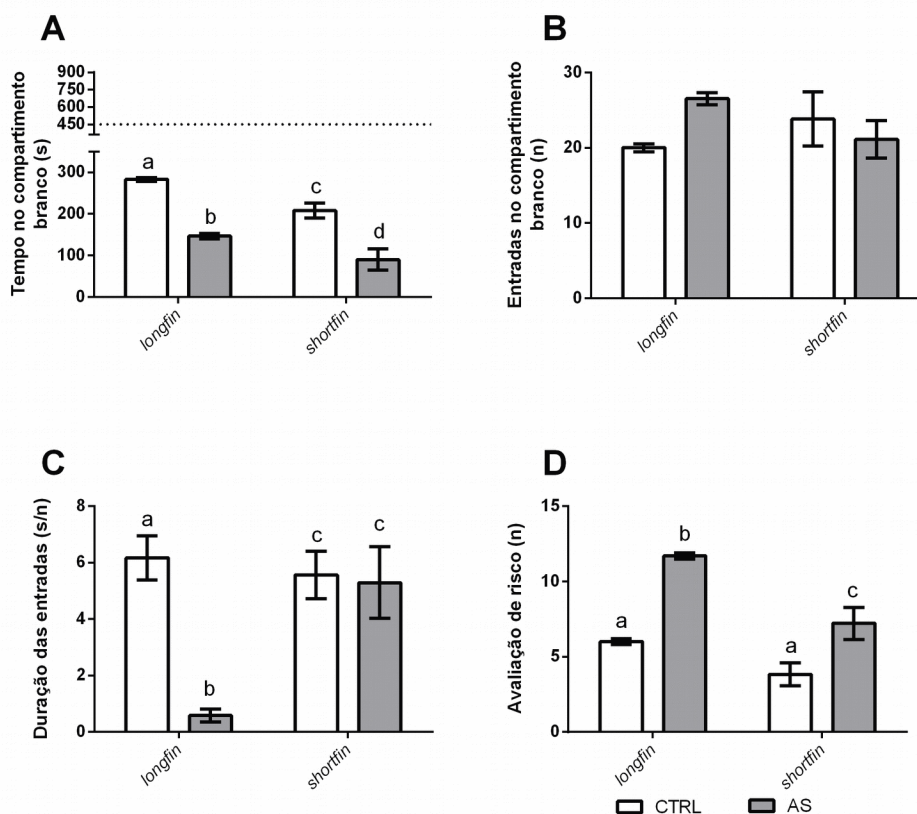


Figura 16: Animais longfin apresentam maior sensibilização nas variáveis espaço-temporais de ansiedade no teste de preferência por escuridão. (A) Tempo no compartimento branco; (B) Entradas no compartimento branco; (C) Duração das entradas no compartimento branco; (D) Frequência de avaliação de risco. As barras representam média \pm erro-padrão. CTRL, animais não-expostos (branco); AS, animais expostos à substância de alarme (cinza). Letras iguais representam ausência de diferença, enquanto grupos identificados com letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.

Os dados de tigmotaxia revelaram que há efeitos do tratamento ($F_{1, 39} = 82,49$, $p < 0,0001$), e do fenótipo ($F_{1, 39} = 5,624$, $p = 0,0227$), bem como um efeito de interação ($F_{1, 39} = 10,27$, $p = 0,0027$; Figura 17A). Análise *post-hoc* mostraram aumento da tigmotaxia em animais *longfin* ($p < 0,0001$) e em animais *shortfin* ($p = 0,0023$), mas não há diferença entre *longfin* e *shortfin* não-expostos ($p = 0,936$). A análise estatística revelou efeitos do tratamento ($F_{1, 39} = 17,49$, $p = 0,0002$) e do fenótipo ($F_{1, 39} = 34,93$, p

<0,0001), além do efeito da interação entre as variáveis ($F_{1, 39} = 4,347$, $p = 0,0437$), no nado errático (Figura 17B). A análise *post-hoc* revelou ainda aumento no nado errático em paulistinhas *shortfin* ($p = 0,0011$), mas não entre paulistinhas *longfin* ($p = 0,3798$); não foram encontradas diferenças entre *longfin* e animais *shortfin* não-expostos ($p = 0,051$). Finalmente, com relação ao congelamento, não há efeitos de fenótipo ($F_{1, 39} = 1,713$, NS) ou tratamento ($F_{1, 39} = 1,586$, NS; Figura 17C).

Experimento 2: Diferenças entre fenótipos (Parte 2)

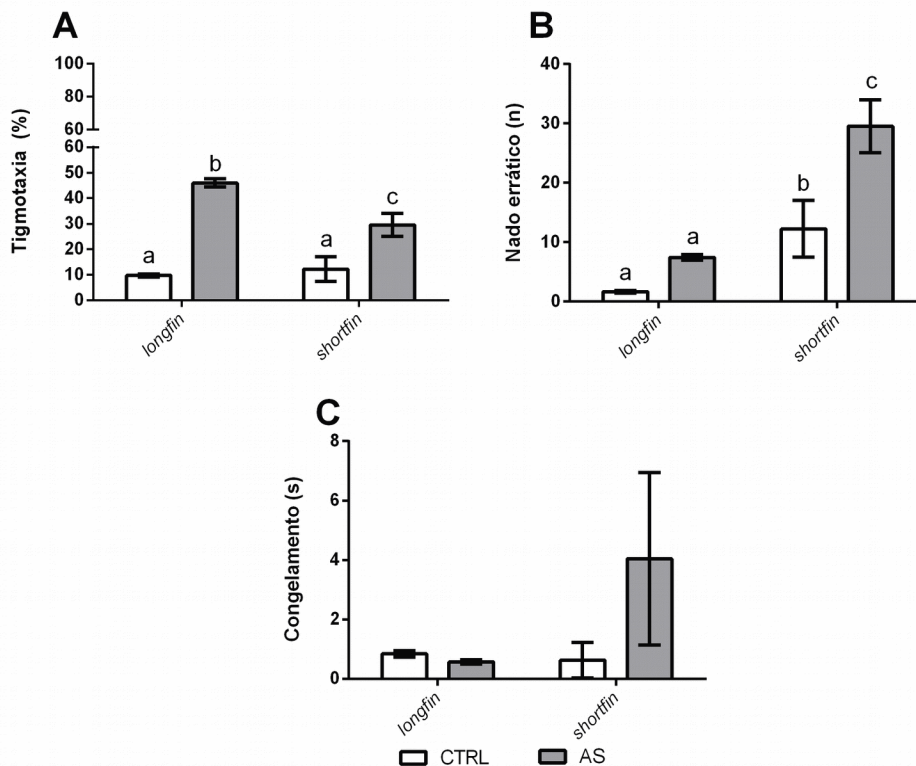


Figura 17: Animais *longfin* apresentam maior sensibilização na tigmotaxia, mas não nado errático, no teste de preferência por escuridão. (A) Tempo no compartimento branco; (B) Entradas no compartimento branco; (C) Duração das entradas no compartimento branco; (D) Frequência de avaliação de risco. As barras representam média \pm erro-padrão. CTRL, animais não-expostos (branco); AS, animais expostos à substância de alarme (cinza). Letras iguais representam ausência de diferença, enquanto grupos identificados com letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas.

5.3. *A aplicação de Critérios Comportamentais de Corte revela diferenças individuais na sensibilização à SA*

As Figuras 18 e 19 mostram os dados referentes ao ensaio de preferência pela escuridão, realizados no experimento 3. Depois de 24h após a exposição à SA, os paulistinhas do fenótipo *longfin* tiveram uma diminuição do tempo no compartimento branco ($t_{df = 58} = -5,675$, $p < 0,0001$; Figura 18A), diminuição nas durações da entrada no compartimento branco ($t_{gl = 58} = -2,349$, $p = 0,0223$) (Figura 18C) e aumento da avaliação de risco ($U_{gl = 58} = 115,0$, $p < 0,0001$) (Figura 18D), do nado errático ($U_{gl = 58} = 172,0$, $p < 0,0001$; Figura 19B) e tigmotaxia ($t_{gl = 58} = 7,509$, $p < 0,0001$; Figura 19A). Já o número de entradas ($U_{gl = 58} = 408$, NS; Figura 18B) e congelamento ($t_{gl = 58} = 0,8074$, NS; Figura 19C) não diferiram entre os animais expostos e não expostos.

Experimento 3: Preferência por escuridão (Parte 1)

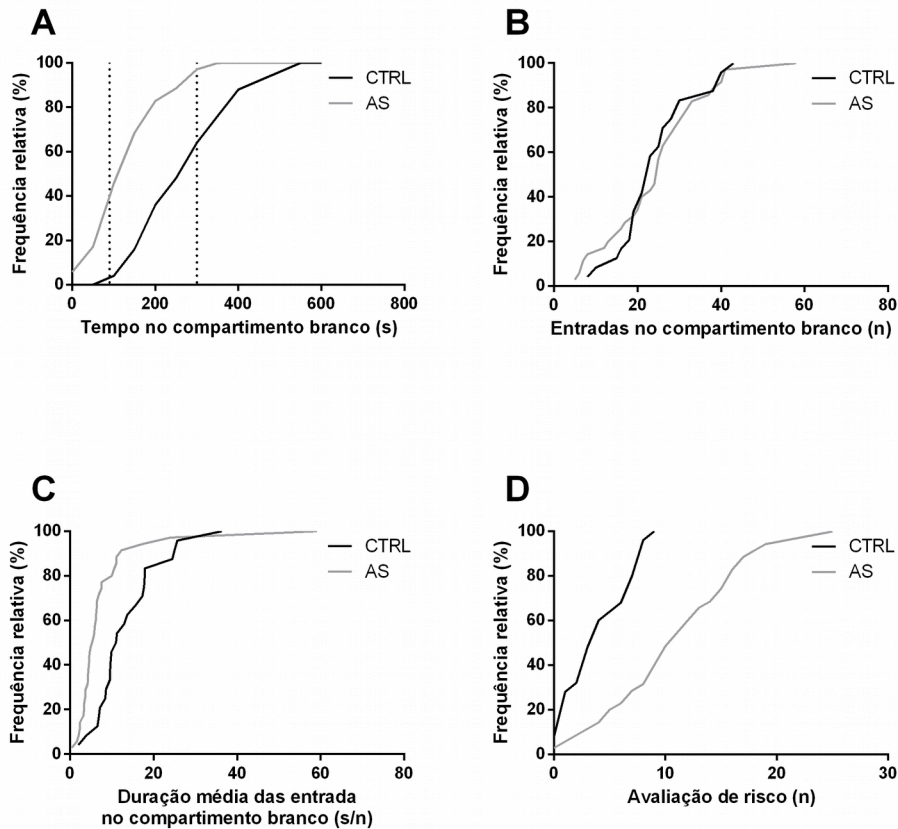


Figura 18: A exposição à SA sensibiliza variáveis espaço-temporais de ansiedade no teste de preferência por escuridão em paulistinhas longfin 24 h após a exposição. (A) Tempo no compartimento branco; (B) Entradas no compartimento branco; (C) Duração das entradas no compartimento branco; (D) Frequência de avaliação de risco. As linhas representam distribuições de frequência relativa. CTRL, animais não-expostos (linhas pretas); AS, animais expostos à substância de alarme (linhas cinzas). As linhas pontilhadas em A representam os pontos de corte para animais RCE e RCM (ver Figuras 6 e 18).

Experimento 3: Preferência por escuridão (Parte 2)

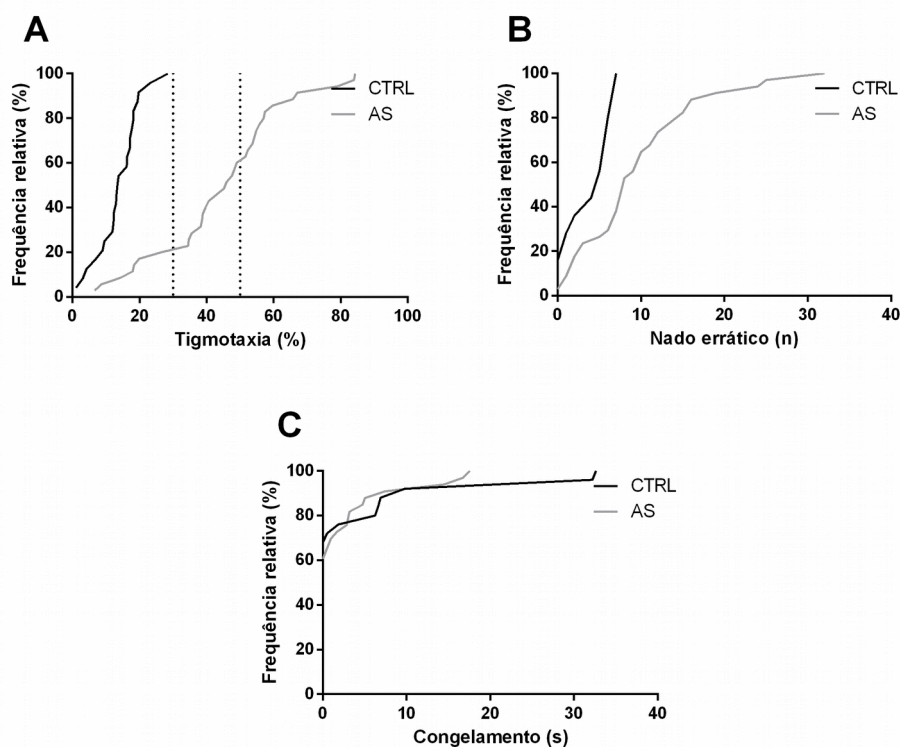


Figura 19: A exposição à SA sensibiliza variáveis etológicas de ansiedade no teste de preferência por escuridão em paulistinhas longfin 24 h após a exposição. (A) Tempo em tigmotaxia no compartimento branco; (B) Frequência de nado errático; (C) Duração do congelamento no compartimento branco. As linhas representam distribuições de frequência relativa. CTRL, animais não-expostos (linhas pretas); AS, animais expostos à substância de alarme (linhas cinzas). As linhas pontilhadas em A representam os pontos de corte para animais RCE e RCM (ver Figuras 8 e 20).

Após a aplicação dos Critérios Comportamentais de Corte, 25,74% dos animais que foram expostos a SA alcançaram o critério de RCE e 20% atingiram o critério para RCM 24 h após a exposição ao estímulo; em animais não-expostos, apenas 4% alcançaram o critério de RCE e 96% alcançaram o critério de RCM, como mostrado na Figura 20A (teste exato de Fisher, $p = 0,034$).

Animais classificados como RCE dispenderam menos tempo no compartimento branco em relação tanto aos controles e aos animais classificados como RCM ($F_{2, 38} = 17,53$, $p < 0,0001$; Figura 20B). O número de entradas no compartimento branco (Figura 20C) não diferiu significativamente entre os grupos ($H_{gl} = 38 = 0,7635$, NS), mas a duração entrada foi menor em animais classificados como RCE em relação a animais classificados como RCM e controles não-expostos (Figura 20D; $F_{2, 38} = 3,546$, $p = 0,039$).

Crítérios Comportamentais de Corte (Parte 1)

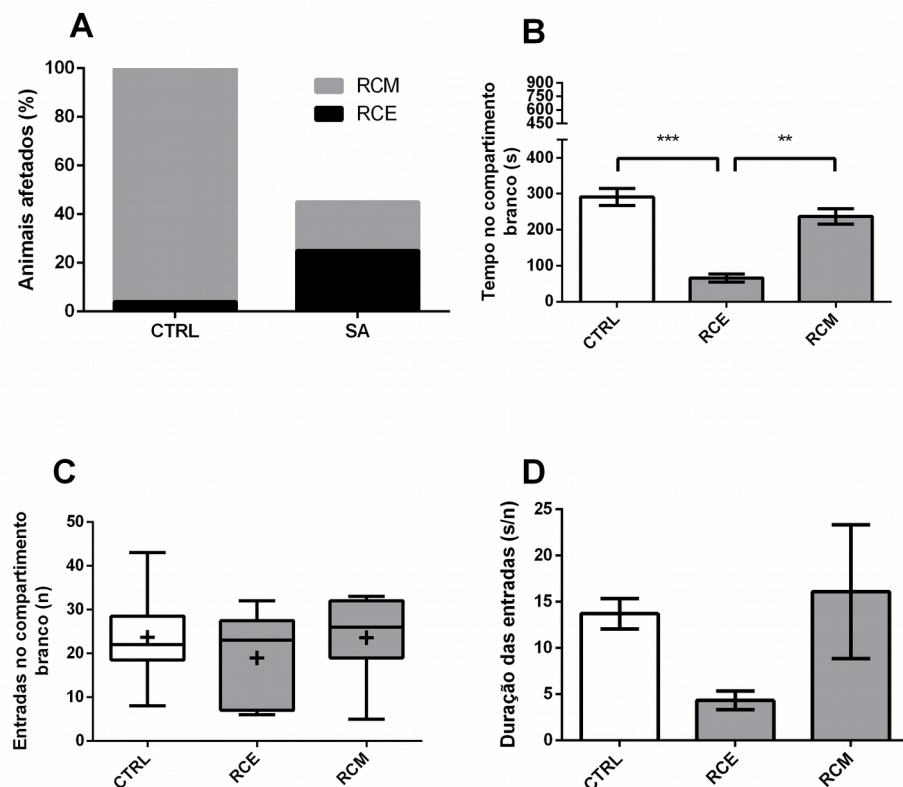


Figura 20: Animais que apresentam Resposta Comportamental Extrema diferem no tempo no compartimento branco, mas não em outras variáveis espaço-temporais no teste de preferência por escuridão. (A) Incidência de animais apresentando Resposta Comportamental Extrema (RCE, preto) ou Resposta Comportamental Mínima (RCM, cinza) 24 h após exposição a água (CTRL) ou substância de alarme (SA). (B) Tempo no compartimento branco; (C) Número de entradas no compartimento branco; (D) Duração das entradas no compartimento branco. As barras representam média \pm erro-padrão, enquanto os boxplots representam dados do 25° ao 75° percentil (caixas) e do valor mínimo ao valor máximo (barras), com o símbolo + indicando a posição da média. Em B-D, as barras ou caixas cinzas representam animais expostos à SA, enquanto as barras ou caixas cinzas representam animais não-expostos. CTRL, animais não-expostos; RCE, Respostas Comportamental Extrema; RCM, Resposta Comportamental Mínima. ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$.

A avaliação de risco foi maior em ambos RCE e RCM em relação aos controles (Figura 21A; $H_{gl=38} = 16,66$, $p = 0,0002$), e a tigmotaxia foi maior em RCE em relação a RCM e controles (Figura 21B; $F_{2,38} = 76,66$, $p < 0,0001$). O nado errático (Figura 21C) foi maior em animais RCE em relação aos controles, mas não RCM ($H_{gl=38} = 10,28$, $p = 0,0059$), mas o congelamento não diferiu entre os grupos ($F_{2,38} = 0,1$, NS; Figura 21D).

Critérios Comportamentais de Corte (Parte 2)

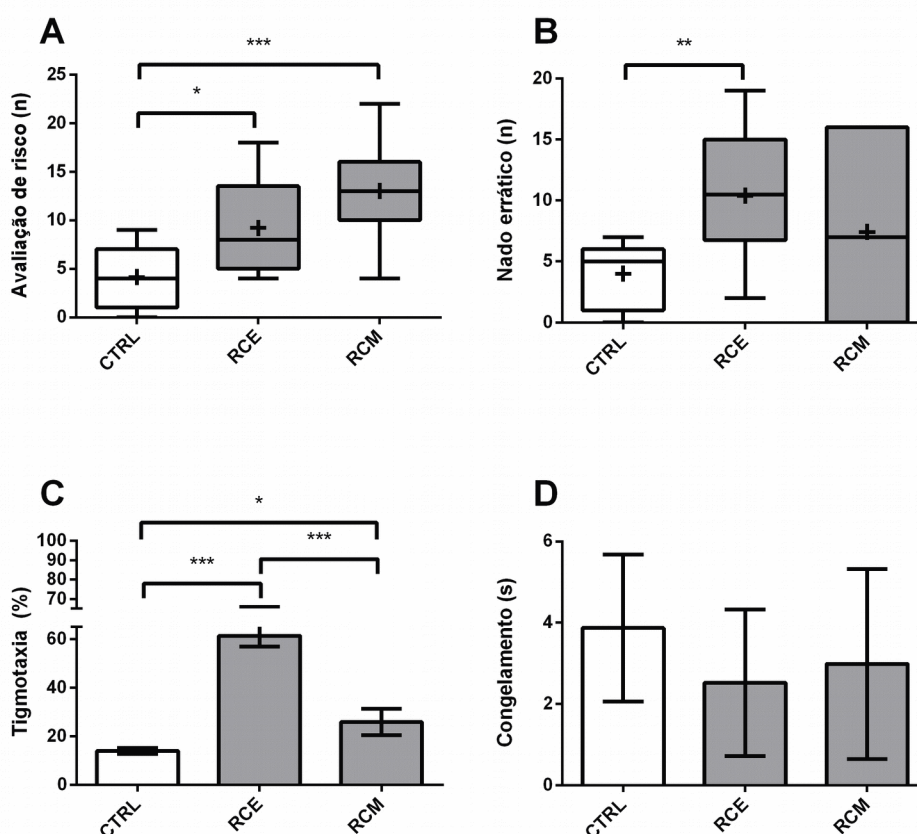


Figura 21: Animais que apresentam Resposta Comportamental Extrema diferem em variáveis etológicas no teste de preferência claro/escuro. (A) Frequência de avaliação de risco; (B) Frequência de nado errático; (C) Tempo em tigmotaxia no compartimento branco; (D) Duração do congelamento no compartimento branco. As barras representam média \pm erro-padrão, enquanto os boxplots representam dados do 25° ao 75° percentil (caixas) e do valor mínimo ao valor máximo (barras), com o símbolo + indicando a posição da média. As barras ou caixas cinzas representam animais expostos à SA, enquanto as barras ou caixas brancas representam animais não-expostos. CTRL, animais não-expostos; RCE, Respostas Comportamental Extrema; RCM, Resposta Comportamental Mínima. ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

5.4. A exposição à SA eleva o glutamato extracelular e o nitrito tecidual no telencéfalo

Dois picos de glutamato foram observados no meio extracelular do telencéfalo de animais expostos (tratamento: $F_{1, 15} = 20,71$, $p = 0,0004$; tempo: $F_{3, 15} = 3,092$, $p = 0,05$; interação: $F_{3, 15} = 6,939$, $p = 0,0038$), com elevações observadas imediatamente após a estimulação e 30 min após exposição (Figura 22A). Os níveis de NO_x^- se apresentaram elevados imediatamente após a exposição, e 30 min, 90 min e 24 h após a exposição (tratamento: $F_{1, 35} = 50,6$, $p < 0,0001$; tempo: $F_{4, 35} = 4,677$, $p = 0,0039$; interação: $F_{4, 35} = 4,164$, $p = 0,0073$; Figure 22B).

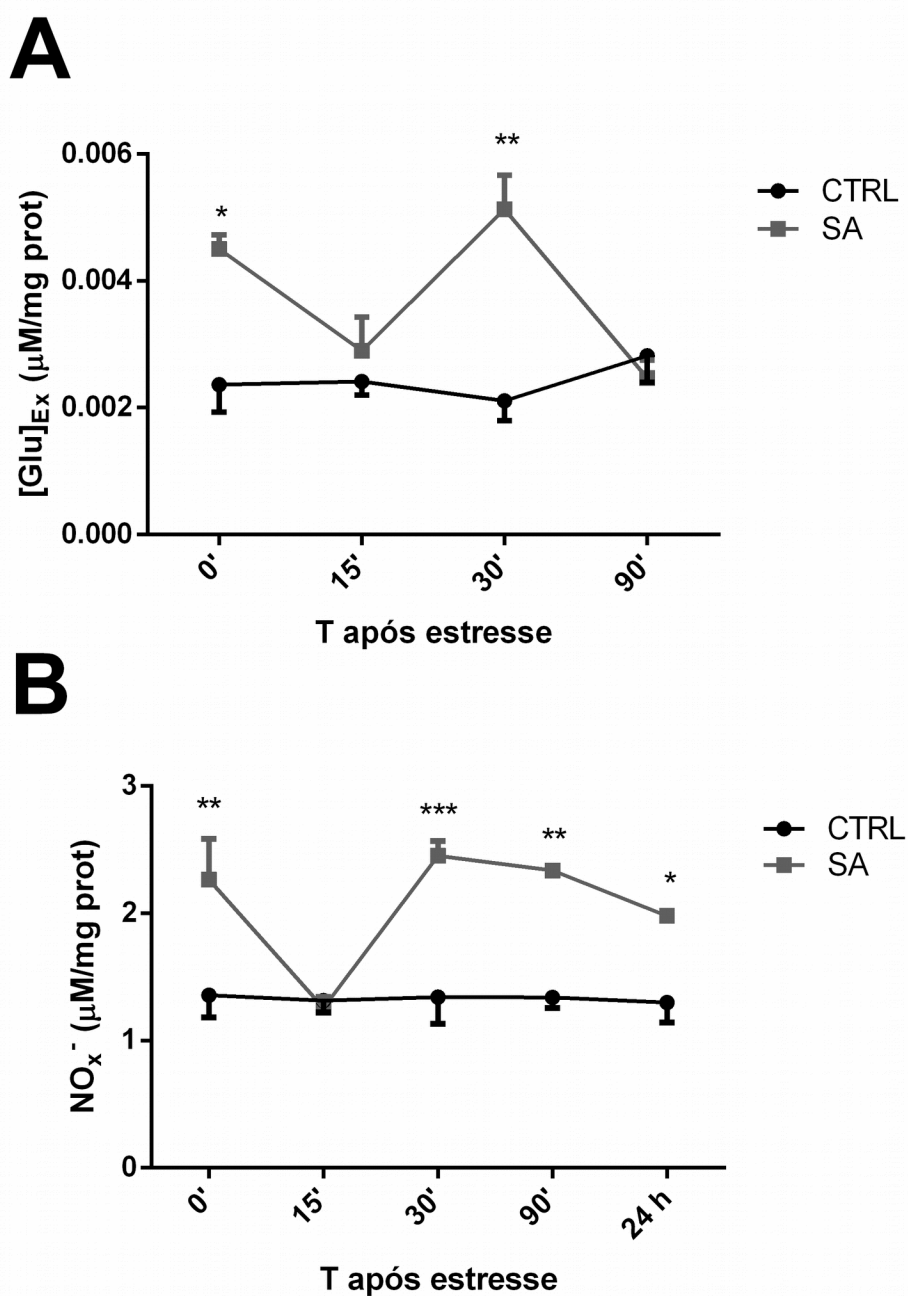


Figura 22: Curso temporal das alterações no conteúdo telencefálico de (A) glutamato e (B) NO_x⁻. O glutamato foi mensurado no fluido extracelular extraído pelo método de PRADEL et al. (1999); o nitrito foi mensurado em homogenatos. O eixo das abcissas representa o tempo de sacrifício e dissecação após o estresse. Os pontos representam médias erro-padrão. CTRL, animais não-expostos (círculos pretos); SA, animais expostos à substância de alarme (quadrados cinzas) ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

5.5. O tratamento com L-NAME 30 minutos antes da exposição à SA não bloqueia a sensibilização comportamental no teste de preferência por escuridão

Os resultados obtidos com o tratamento de L-NAME 30 minutos antes da exposição à SA mostraram um efeito principal do tratamento ($F_{1,37} = 8,66$, $p = 0,005$), mas não da droga ($F_{1,37} = 0,052$, NS) ou interação entre as duas variáveis ($F_{1,37} = 1,759$, NS) no tempo no compartimento branco (Figura 23A). A análise *post-hoc* revelou diferenças estatisticamente significativas entre CTRL + VEH e ambos os grupos tratados com SA, bem como entre CTRL + L-NAME e ambos os grupos tratados com SA ($p < 0,05$).

Nem o tratamento ($F_{1,37} = 0,2821$, NS) nem a droga ($F_{1,37} = 2,712$, NS) ou o efeito de interação ($F_{1,37} = 0,1614$, NS) afetaram o número de entradas no compartimento branco (Figura 23B). Um efeito principal do tratamento foi observado na duração de entradas no compartimento branco ($F_{1,37} = 6,832$, $p = 0,0129$), sem um efeito da dose da droga ($F_{1,37} = 2,614$, NS) ou interação entre as variáveis ($F_{1,37} = 0,3169$, NS). Porém, a análise *post-hoc* detectou uma diferença entre CTRL + VEH e SA + L-NAME (Figura 23C; $p < 0,05$).

Com relação à variável de avaliação de risco, houve diferença significativa com relação ao tratamento ($F_{1,37} = 23,67$, $p < 0,0001$), mas não com relação à dose da droga ($F_{1,37} = 1,266$, NS) ou com relação à interação das variáveis ($F_{1,37} = 0,3787$, NS) (Figura 23D); a análise *post-hoc* mostrou diferenças entre CTRL + VEH e SA + VEH ($p < 0,05$), CTRL + VEH e SA + L-NAME ($p < 0,01$), CTRL + L-NAME e SA + VEH ($p < 0,05$) e CTRL + L-NAME e SA + L-NAME ($p < 0,01$).

L-NAME - Pré-tratamento 30 min antes do estresse (Parte 1)

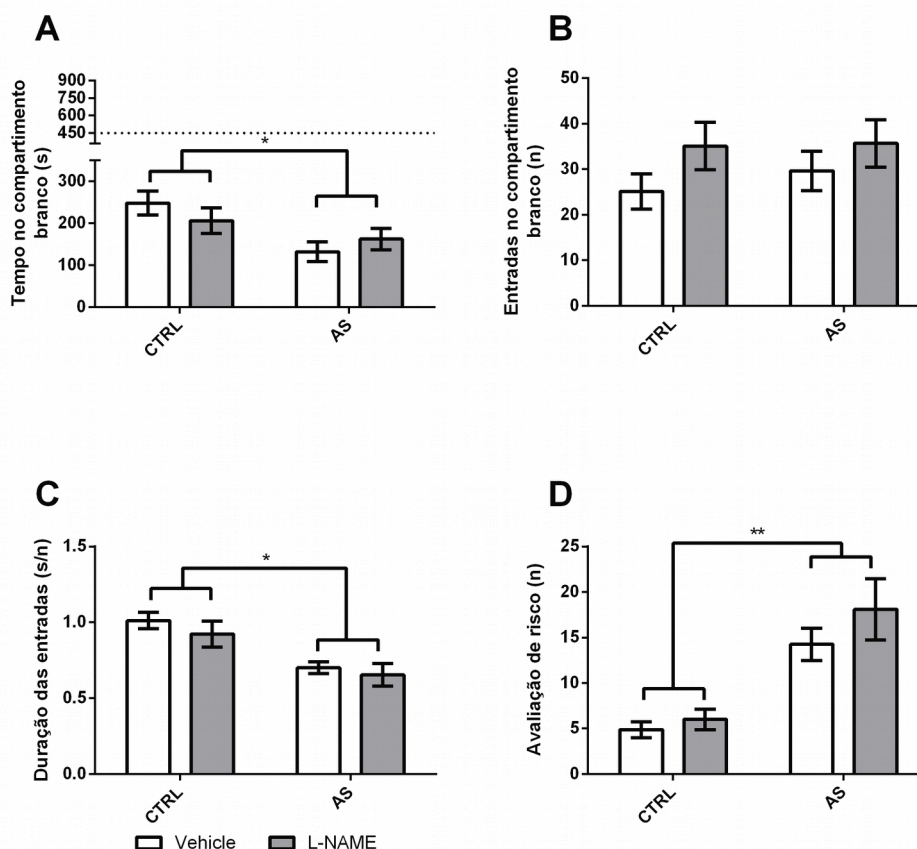


Figura 23: O pré-tratamento com L-NAME não bloqueou a sensibilização causada pela SA 24 h após a exposição. (A) Tempo no compartimento branco; (B) Entradas no compartimento branco; (C) Duração das entradas no compartimento branco; (D) Frequência de avaliação de risco. As barras representam média \pm erro-padrão. CTRL, animais não-expostos; AS, animais expostos à substância de alarme. As cores das barras identificam animais pré-tratados com veículo (barras brancas) ou L-NAME (barras cinzas). **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

Do mesmo modo, um principal efeito do tratamento ($F_{1,37} = 11,99$, $p = 0,0013$), mas não da droga ($F_{1,37} = 0,045$, NS), foi encontrada no nado errático (Figura 24A), para o qual uma interação entre o tratamento e a dose da droga também estava ausente ($F_{1,37} = 2,591$, NS); a análise *post-hoc* revelou diferenças entre CTRL + VEH e ambos os grupos expostos à SA ($p < 0,01$) e entre CTRL + L-NAME e ambos os grupos expostos à SA ($p < 0,05$).

Na avaliação de tigmotaxia, houve efeito do tratamento ($F_{1,37} = 10,99$, $p < 0,0021$), mas não da dose de droga ($F_{1,37} = 0,912$, NS), nem interação entre variáveis ($F_{1,37} = 0,3536$, NS) (Figura 24B); a análise *post-hoc* descobriu diferenças entre os dois grupos CTRL e ambos os grupos expostos à SA ($p < 0,05$). Finalmente, não houveram efeitos do tratamento ($F_{1,37} = 2.791$, NS), da droga ($F_{1,37} = 0,066$, NS) ou interação ($F_{1,37} = 0,0898$, NS) no congelamento (Figura 24C).

L-NAME - Pré-tratamento 30 min antes do estresse (Parte 2)

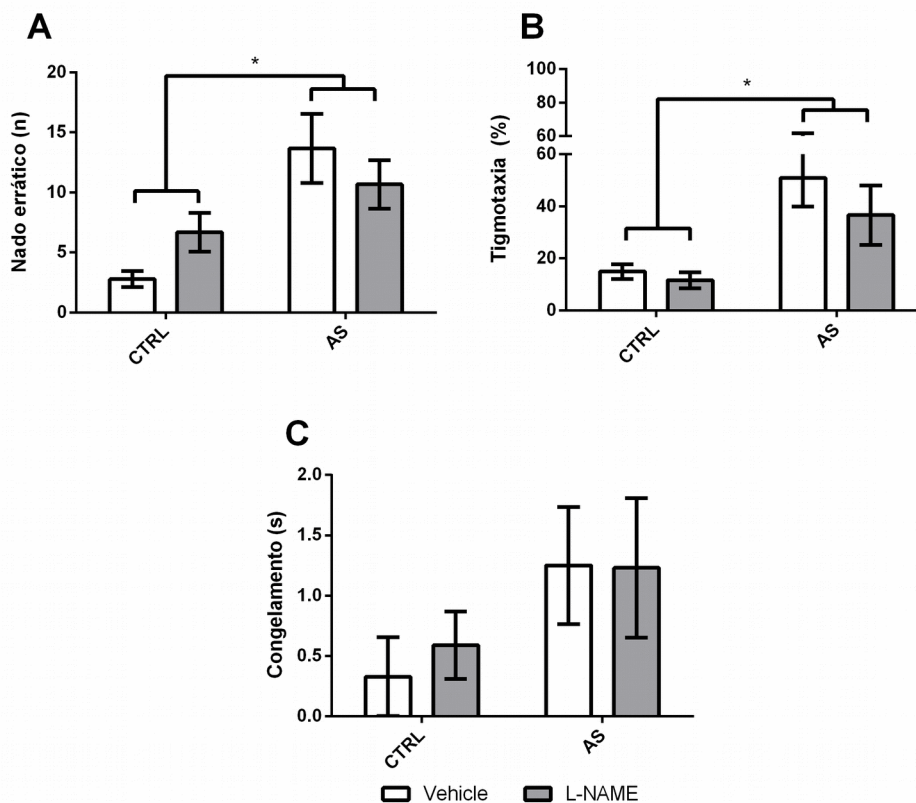


Figura 24: O pré-tratamento com L-NAME não bloqueou a sensibilização causada pela SA 24 h após a exposição. (A) Frequência de nado errático; (B) Tempo em tigmotaxia no compartimento branco; (C) Duração do congelamento no compartimento branco. As barras representam média \pm erro-padrão. CTRL, animais não-expostos; AS, animais expostos à substância de alarme. As cores das barras identificam animais pré-tratados com veículo (barras brancas) ou L-NAME (barras cinzas). *, $p < 0.05$.

5.6. O tratamento com L-NAME 30 minutos após a exposição à SA bloqueia a sensibilização da escototaxia e da avaliação de risco

A análise estatística dos resultados obtidos com o tratamento com L-NAME 30 minutos após a exposição à SA revelou que há um efeito principal do tratamento ($F_{1,45} = 4,61$, $p = 0,0372$), com relação ao tempo que o animal passou no compartimento branco (Figura 25A), bem como uma interação tratamento x droga ($F_{1,45} = 19,7$, $p < 0,0001$); a análise *post-hoc* revelou que o pós-tratamento com L-NAME bloqueou o efeito da exposição à SA sobre essa variável.

Novamente, não houveram efeitos significativos do tratamento ($F_{1,45} = 1,369$, NS), da droga ($F_{1,45} = 3,908$, NS) ou da interação entre as variáveis ($F_{1,45} = 0,822$, NS) sobre o número de entradas no compartimento branco (Figura 25B). Porém, um efeito do tratamento ($F_{1,45} = 6,348$, $p = 0,0154$) e da interação tratamento x droga ($F_{1,45} = 6,353$, $p = 0,0153$) foram observados na duração das entradas no compartimento branco (Figura 25C), e a análise *post-hoc* revelou que o L-NAME bloqueou o efeito da exposição à SA sobre essa variável.

Na avaliação de risco, os efeitos de tratamento ($F_{1,45} = 6,001$, $p = 0,018$) e da droga ($F_{1,45} = 5,572$, $p = 0,0226$), bem como da interação entre variáveis ($F_{1,45} = 17,16$, $p = 0,0001$) foram estatisticamente significativos (Figura 25D). A análise *post-hoc* revelou que o tratamento com L-NAME bloqueou o aumento da avaliação de risco após exposição à SA.

L-NAME - Pós-tratamento 30 min após o estresse (Parte 1)

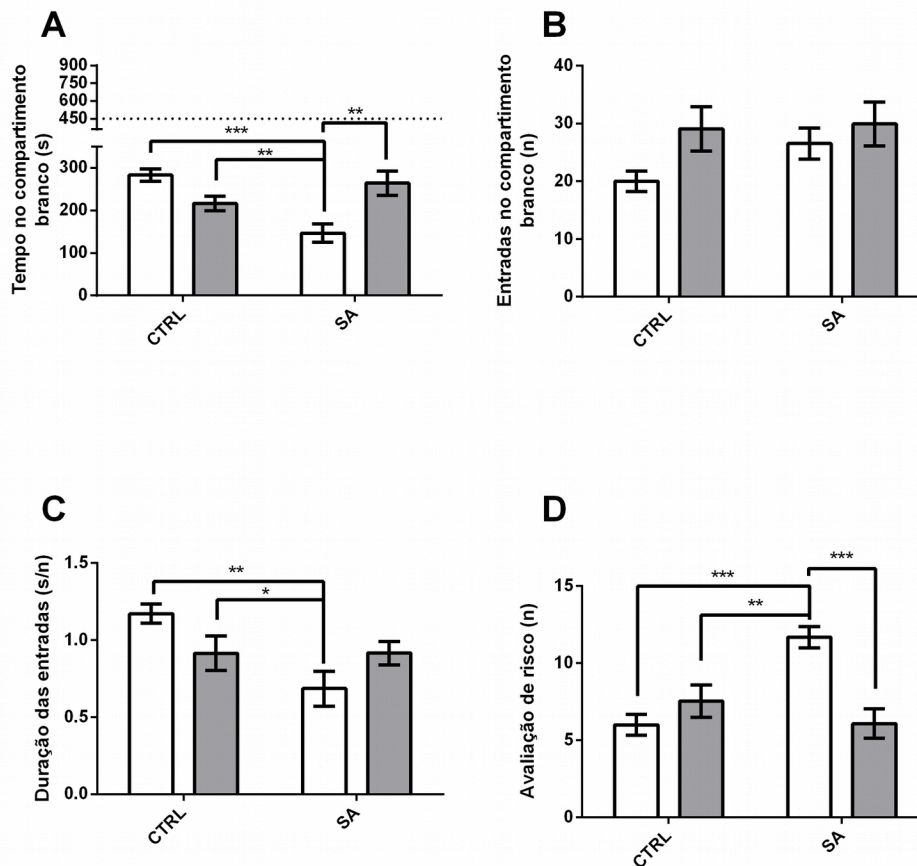


Figura 25: O tratamento com L-NAME 30 min após o estresse bloqueou a sensibilização da escototaxia e da avaliação de risco causadas pela SA 24 h após a exposição. (A) Tempo no compartimento branco; (B) Entradas no compartimento branco; (C) Duração das entradas no compartimento branco; (D) Frequência de avaliação de risco. As barras representam média \pm erro-padrão. CTRL, animais não-expostos; AS, animais expostos à substância de alarme. As cores das barras identificam animais pré-tratados com veículo (barras brancas) ou L-NAME (barras cinzas). ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

Com relação ao nado errático, houve um efeito do tratamento ($F_{1,45} = 16,32$, $p = 0,0002$), mas não da droga ($F_{1,45} = 0,4252$, NS), nem um efeito de interação ($F_{1,45} = 1,284$, NS); a análise *post-hoc* mostrou diferenças entre os grupos CTRL e ambos os grupos expostos à SA (Figura 26A). Do mesmo modo, na avaliação da variável de tigmotaxia houve efeito principal do tratamento ($F_{1,45} = 61,95$, $p < 0,0001$), mas não da

droga ($F_{1,45} = 0,127$, NS) ou da interação entre as variáveis ($F_{1,45} = 0,4669$, NS) (Figura 26B), com diferenças entre ambos os grupos CTRL e ambos os grupos expostos à SA ($p < 0,05$). A análise estatística ainda revelou não haver efeito significativo do tratamento ($F_{1,45} = 0,0138$, NS), da droga ($F_{1,45} = 0,1566$, NS) ou interação entre as variáveis ($F_{1,45} = 1,125$, NS) sobre o tempo em congelamento (Figura 26C).

L-NAME - Pós-tratamento 30 min após o estresse (Parte 2)

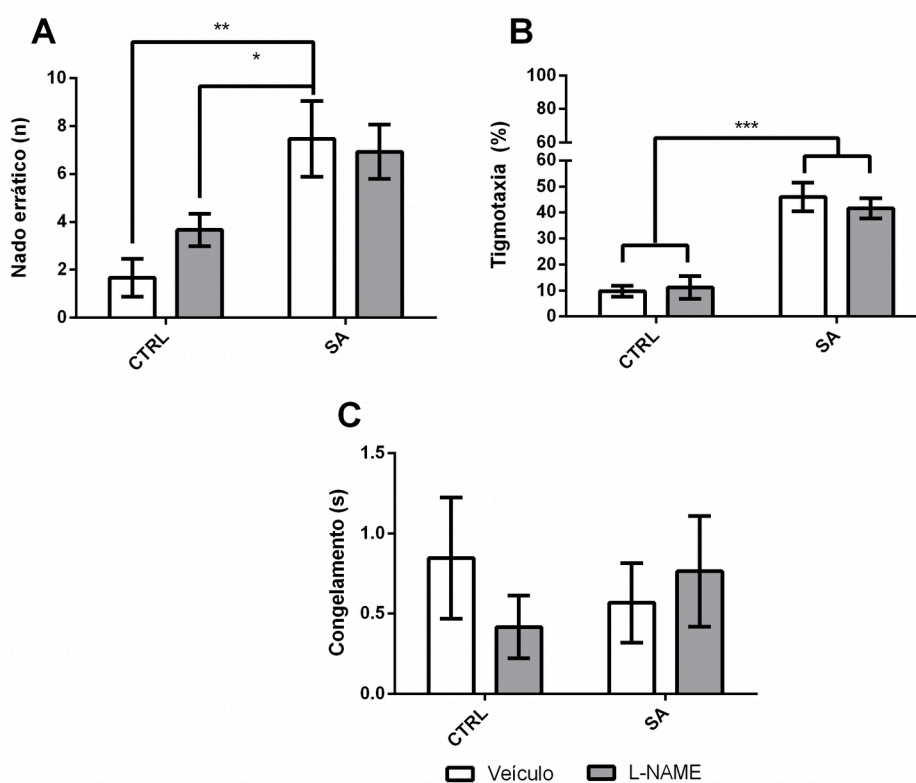


Figura 26: O tratamento com L-NAME 30 min após o estresse não bloqueou a sensibilização da tigmotaxia ou do nado errático causadas pela SA 24 h após a exposição. (A) Frequência de nado errático; (B) Tempo de tigmotaxia no compartimento branco; (C) Duração do congelamento no compartimento branco. As barras representam média \pm erro-padrão. CTRL, animais não-expostos; AS, animais expostos à substância de alarme. As cores das barras identificam animais pré-tratados com veículo (barras brancas) ou L-NAME (barras cinzas). ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

5.7. O tratamento com L-NAME 90 minutos após a exposição à SA bloqueia a sensibilização da avaliação de risco, nado errático e tigmotaxia

Nessa condição de tratamento, a análise estatística dos dados revelou um efeito principal do tratamento ($F_{1,34} = 7,755$, $p = 0,0087$), mas não da droga ($F_{1,34} = 0,3783$, NS) ou do efeito de interação ($F_{1,34} = 0,8155$, NS), com relação ao tempo no compartimento branco (Figura 27A). Diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre os dois grupos CTRL e ambos os grupos expostos à SA.

Nenhum efeito do tratamento ($F_{1,34} = 0,04685$, NS), droga ($F_{1,34} = 0,0145$, NS) ou interação ($F_{1,34} = 0,36$, NS) foram observados nas entradas no compartimento branco (Figura 27B). Com relação à duração das entradas no compartimento branco, houve um efeito principal do tratamento ($F_{1,34} = 7,53$, $p = 0,0096$), mas não da droga ($F_{1,34} = 0,7846$, NS) ou da interação entre as variáveis ($F_{1,34} = 2,743$, NS) (Figura 27C); com a análise *post-hoc* detectar diferenças entre os dois grupos CTRL e ambos os grupos expostos à SA.

Na avaliação de risco, houve um principal efeito do tratamento ($F_{1,34} = 6,506$, $p = 0,0154$), mas não da droga ($F_{1,34} = 0,2734$, NS) (Figura 27D); um efeito de interação também foi observado ($F_{1,34} = 13,31$, $p = 0,0009$). A análise *post-hoc* revelou que o L-NAME bloqueou o aumento da avaliação de risco causado pela exposição à SA.

L-NAME - Pós-tratamento 90 min após o estresse (Parte 1)

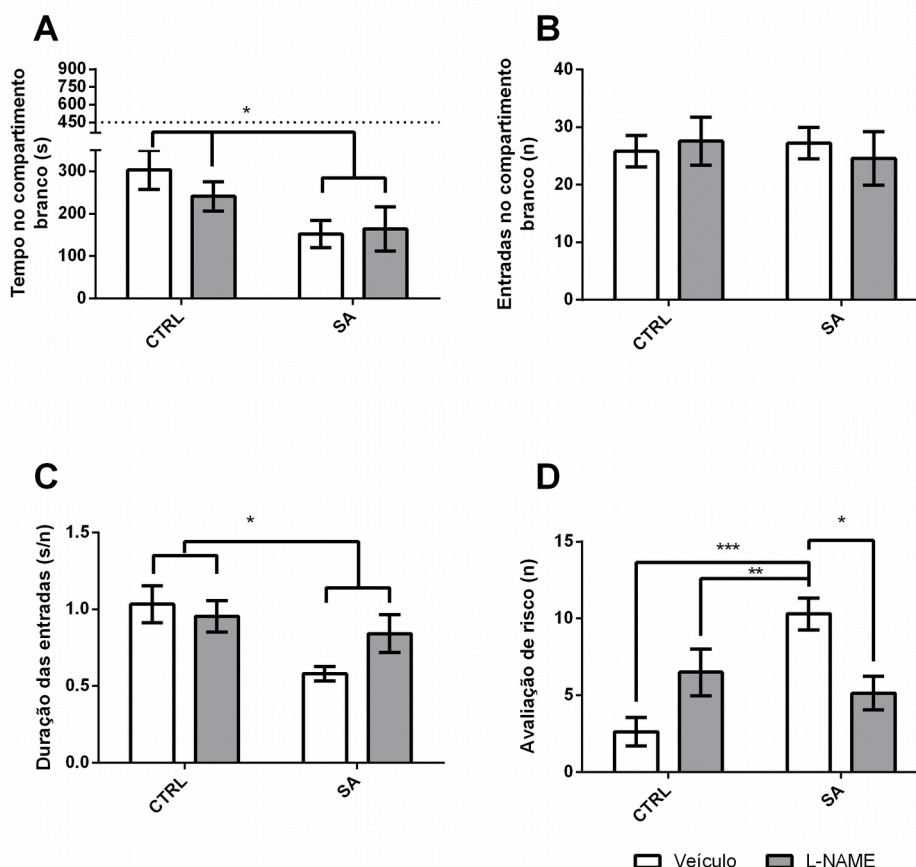


Figura 27: O tratamento com L-NAME 90 min após o estresse não bloqueou a sensibilização da escototaxia causada pela SA 24 h após a exposição, mas bloqueou a sensibilização da avaliação de risco. (A) Tempo no compartimento branco; (B) Entradas no compartimento branco; (C) Duração das entradas no compartimento branco; (D) Frequência de avaliação de risco. As barras representam média \pm erro-padrão. CTRL, animais não-expostos; AS, animais expostos à substância de alarme. As cores das barras identificam animais pré-tratados com veículo (barras brancas) ou L-NAME (barras cinzas). ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$.

No nado errático, tanto efeito da interação ($F_{1,34} = 29,91$, $p < 0,0001$) quanto o efeito do tratamento principal ($F_{1,34} = 15,95$, $p = 0,0003$) foram estatisticamente significativos, mas o mesmo não ocorreu com relação ao efeito da droga ($F_{1,34} = 0,3047$, $p = 0,5845$) (Figura 28A); análise *post-hoc* apresentou diferenças entre CTRL + VEH e SA + VEH, bem como entre SA + VEH e SA + L-NAME. Já com relação ao tempo em tigre

motaxia, os efeitos de tratamento ($F_{1,34} = 16,61$, $p = 0,0003$), da droga ($F_{1,34} = 172,2$, $p < 0,0001$), bem como um efeito de interação ($F_{1,34} = 12,33$, $p = 0,0013$) foram estatisticamente significativos (Figura 28B); a análise *post-hoc* sugere que o L-NAME bloqueou o efeito da SA sobre a tigmotaxia. Finalmente, não houveram efeitos principais de tratamento ($F_{1,34} = 0,2191$, NS) ou da droga ($F_{1,34} = 0,7069$, NS), nem interação ($F_{1,34} = 0,589$, NS), sobre o tempo em congelamento (Figura 28C).

L-NAME - Pós-tratamento 90 min após o estresse (Parte 2)

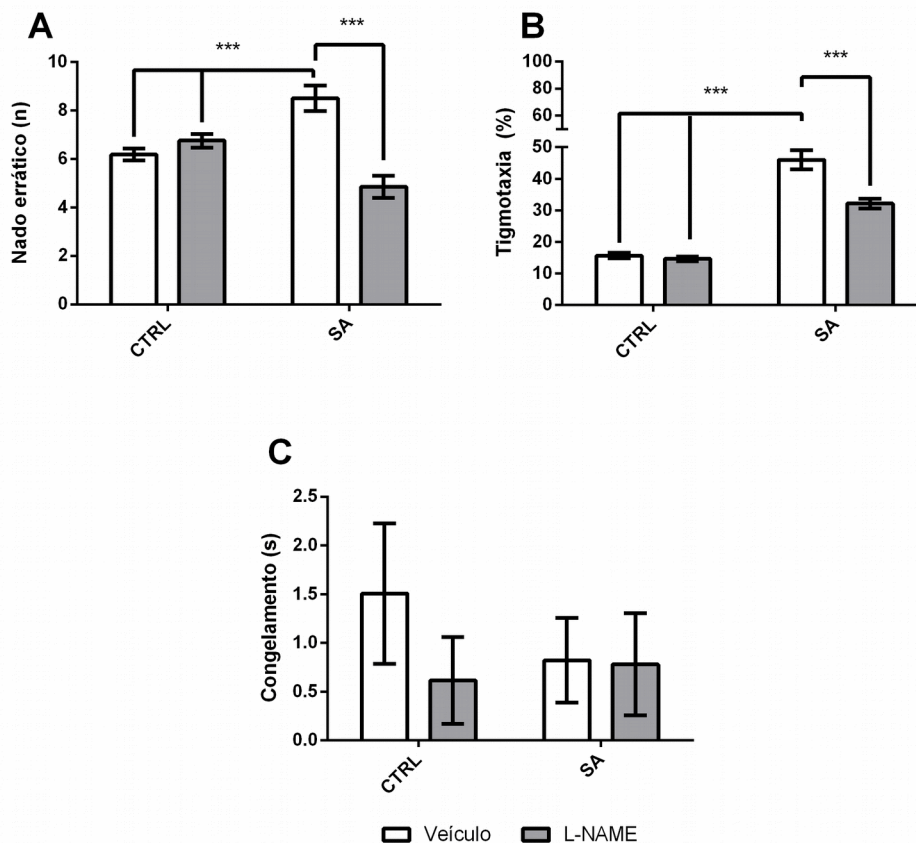


Figura 28: O tratamento com L-NAME 90 min após o estresse bloqueou a sensibilização do nado errático e da tigmotaxia causada pela SA 24 h após a exposição. (A) Frequência de nado errático; (B) Tempo em tigmotaxia no compartimento branco; (C) Duração do congelamento no compartimento branco. As barras representam média \pm erro-padrão. CTRL, animais não-expostos; AS, animais expostos à substância de alarme. As cores das barras identificam animais pré-tratados com veículo (barras brancas) ou L-NAME (barras cinzas). ***, $p < 0,01$.

6. Discussão

6.1. *Hipótese 1: A SA deve sensibilizar o comportamento tipo-ansiedade em ambos os testes e aumentar a responsividade a estímulos de sobressalto*

O Experimento 1 avaliou os efeitos atrasados ou sustentados da SA sobre comportamentos tipo-ansiedade em dois testes comumente utilizados, o teste de distribuição vertical eliciada pela novidade e o teste de preferência por escuridão; além disso, as respostas de sobressalto também foram avaliadas. Esses testes representam domínios de hipervigilância e sobressalto exagerado (Tabela 1), em paralelo com as baterias de testes utilizadas em roedores para avaliar modelos de TEPT (COHEN et al., 2012; MATAR; ZOHAR; COHEN, 2013).

Demonstrou-se elevação da geotaxia e abolição da habituação no teste de distribuição vertical eliciada pela novidade, assim como aumento no nado errático e *thrashing*, sem alterações nos saltos e em respostas de congelamento. No teste de preferência por escuridão, a SA produziu um aumento da escototaxia, nado errático, avaliação de risco, e tigmotaxia 24 h após a exposição. Essas observações contrastam com os efeitos agudos imediatamente após a exposição à SA, que aumenta a geotaxia, o nado errático e o congelamento, mas não abole a habituação (EGAN et al., 2009); no teste de preferência por escuridão, igualmente, observa-se aumento na escototaxia, nado errático e congelamento, sem alterações na avaliação de risco, imediatamente após a exposição (MAXIMINO et al., 2014b). Além disso, a exposição a modelos de predador aumenta a frequência de saltos e nado errático (AHMED; FERNANDES; GERLAI, 2012; BASS; GERLAI, 2008; GERLAI; FERNANDES; PEREIRA, 2009). Esses resultados sugerem que os efeitos observados em ambos os testes 24 h após a substância de alarme não representam somente “efeitos residuais” sustentados em resposta a um estímulo de medo, mas um estado de ansiedade persistentemente elevada, e são reminiscentes do observado em roedores (ADAMEC et al., 1998; WANG et al., 2012; YAMAMOTO et al., 2009).

A exposição prolongada (24 ou 72 horas) a um predador simpátrico também aumenta o nado errático e a geotaxia, efeitos que foram interpretados como indicadores de TEPT (STEWART et al., 2014b). A geotaxia, comumente interpretada como índice

de ansiedade nesse teste (CACHAT et al., 2010) e elevada pela exposição à SA no Experimento 1, não é consistentemente aumentada por estímulos indutores de medo (PARRA; ADRIAN; GERLAI, 2009; SPEEDIE; GERLAI, 2008), sugerindo que os efeitos atrasados observados aqui representam uma sensibilização às propriedades aversivas da novidade do ambiente ao invés de um estado sustentado de medo.

É difícil especular acerca do significado comportamental de cada uma das variáveis analisadas nesses testes. A escototaxia e a geotaxia parecem ser controladas por motivações diferentes: enquanto a preferência por escuridão parece ser controlada pelo conflito entre a aproximação ao ambiente escuro e a aversão do ambiente claro, a preferência por substrato parece ser controlada essencialmente por uma fuga do topo do aquário (MAXIMINO et al., 2012). Entretanto, o significado de outras variáveis ainda é desconhecido. Por exemplo, no teste de preferência claro/escuro, o congelamento ocorre com maior frequência no compartimento preto, sugerindo que possa representar um componente de orientação mais do que congelamento propriamente dito (BLASER; CHADWICK; MCGINNIS, 2010; BLASER; PEÑALOSA, 2011). Em roedores, existem importantes diferenças de contexto (i.e., novidade vs. expectativa de ameaça), curso temporal (velocidade de habituação) e ajustes de postura entre respostas de orientação e congelamento (HAGENAARS; OITZL; ROELOFS, 2014) que são majoritariamente desconhecidas no paulistinha. A falta de efeitos da SA 24 horas após exposição no congelamento em ambos os testes, sugere que essa manipulação não afeta respostas de orientação; alternativamente, pode-se sugerir que o efeito observado não trata-se de um estado de medo.

Respostas de orientação de roedores estão associadas a comportamentos de avaliação de risco, que inclui componentes de análise pós-deteção e ocorre em contextos de ameaça potencial, mas não imediata (BLANCHARD et al., 2011; HAGENAARS; OITZL; ROELOFS, 2014). Em paulistinhas, um comportamento classificado como “avaliação de risco” é mais claramente observável no teste de preferência por escuridão; uma análise de *cluster* utilizando diversas manipulações farmacológicas demonstrou que essa variável agrupa-se com o nado errático e a latência para entrada no compartimento branco em um componente separado da escototaxia, da tigmotaxia e do congelamento (MAXIMINO et al., 2014c). A observação de um

aumento na avaliação de risco 24 horas após a exposição à SA é consistente com um estado tipo-ansiedade.

Em adição aos efeitos sustentados no comportamento tipo-ansiedade, também foram observados efeitos sobre as respostas de sobressalto. Foram observadas diferenças na amplitude da primeira resposta e na inclinação da habituação, mas não nas medidas de habituação. Esses resultados são remissivos de investigações do papel do telencéfalo na hiperexcitabilidade em outras espécies de peixes (LAMING, 1987; ROONEY; LAMING, 1988), nos quais estímulos ou tratamentos que evocam respostas de maior amplitude tendem a estender a habituação sem mudar a inclinação da habituação. Aqui, os animais não apresentaram habituação mais rápida, mas as respostas iniciais tiveram maior impacto sobre a habituação, sugerindo um efeito sobre a responsividade, mas não sobre a aprendizagem. A habituação do sobressalto é um fenômeno complexo; em larvas de paulistinha, a habituação após treinamento espaçado (“habituação de curto prazo”) depende de receptores NMDA, enquanto a habituação após estimulação de baixa frequência (“habituação rápida”) independe desses receptores glutamatérgicos (ROBERTS et al., 2011). No entanto, é pouco provável que o protocolo de sobressalto utilizado nos presentes experimentos produza habituação de curto prazo, e dessa forma a comparação é difícil.

Em roedores, a maior parte dos modelos de TEPT produz aumento na amplitude das respostas de sobressalto (DASKALAKIS; YEHUDA; DIAMOND, 2013; MATAR; ZOHAR; COHEN, 2013; WHITAKER; GILPIN; EDWARDS, 2014). O estresse predatório também parece atrasar a habituação de respostas de sobressalto em ratos (ADAMEC, 1997). Além disso, esses efeitos são bloqueados pelo pós-tratamento com antagonistas do receptor NMDA imediatamente após o estresse (BLUNDELL; ADAMEC; BURTON, 2005). À luz dessas observações, é possível que o protocolo de sobressalto utilizado no Experimento 1 não seja capaz de discriminar diferenças sutis na habituação entre animais expostos e não-expostos; alternativamente, uma diferença entre espécies pode ser sugerida, com os paulistinhas respondendo à SA com alteração na responsividade, mas não na habituação.

Em linhas gerais, portanto, a Hipótese 1 foi comprovada; ressalta-se que o efeito da SA não necessariamente limita-se a esse domínio, e alterações em padrões de sono,

comportamento agressivo, extinção de medo, e outras variáveis são possíveis.

6.2. Hipótese 2: Os animais do fenótipo *longfin* serão mais susceptíveis à sensibilização dependente de tempo causada pela SA

A Hipótese 2 testou diferenças inter-populações na susceptibilidade à sensibilização dependente de tempo causada pela SA, utilizando o teste de preferência por escuridão. A SA produziu sensibilização em ambas as linhagens, com tamanhos de efeito diferentes para algumas variáveis. Em linhas gerais, os animais do fenótipo *longfin* apresentaram maior efeito da SA na escototaxia, avaliação de risco e tigmotaxia do que animais do fenótipo *shortfin*; nesses últimos, no entanto, foi observada sensibilização do nado errático, o que não ocorreu com animais do fenótipo *longfin*. Assim, não se trata somente de diferenças na magnitude do efeito, mas de estratégias comportamentais diferentes. Seguindo o agrupamento descrito por MAXIMINO *et al.* ((MAXIMINO *et al.*, 2014c), animais do fenótipo *longfin* apresentaram maior sensibilização de medidas de “evitação” (escototaxia, tigmotaxia), enquanto animais do fenótipo *shortfin* apresentaram maior sensibilização de medidas de “avaliação de risco” (avaliação de risco, nado errático).

Essas diferenças também refletem a ansiedade “basal” desses fenótipos. No Experimento 2, foram observadas diferenças entre fenótipos na escototaxia, duração das entradas, e nado errático, com animais do fenótipo *shortfin* apresentando entradas mais longas e maior frequência de nado errático, e animais do fenótipo *longfin* apresentando mais escototaxia. Apesar da diferença de *background* genético e ambiente de criação, essas observações replicam os achados de KIESEL *et al.* (KIESEL *et al.*, 2012), que demonstraram maior geotaxia em animais do fenótipo *longfin* do que em animais do fenótipo *shortfin*. No entanto, não foram observadas diferenças inter-populações no nado errático (KIESEL *et al.*, 2012).

A base genética dessas diferenças é desconhecida e de difícil investigação. A utilização de populações não-endogâmicas deve aumentar a variabilidade genética, diminuindo o impacto da deriva genética aleatória que poderia levar ao desenvolvimento de caracteres herdáveis únicos; assim, ambas as populações representam populações naturais observadas em campo (PARRA; ADRIAN; GERLAI,

2009; SPEEDIE; GERLAI, 2008). É provável que os animais do fenótipo *longfin* apresentem esse fenótipo devido a mutações em um único gene (IOVINE; JOHNSON, 2002), mas não existem linhagens isogênicas de paulistinha; assim, a maior parte dos genes em qualquer população deve estar em heterozigose, diferentemente do que é observado em linhagens isogênicas de camundongos. Como as populações comparadas foram reproduzidas pelo mesmo fornecedor, espera-se que quaisquer efeitos da variação devida a condições não-controladas de criação ou de *background* genético sejam minimizadas; assim, as diferenças entre as duas populações utilizadas no Experimento 2 devem se dever unicamente à deriva genética aleatória e ao acúmulo de mutações espontâneas.

Mesmo considerando-se essas limitações, a observação de que a população *longfin* é mais vulnerável do que a população *shortfin* às alterações comportamentais em resposta a estressores pode contribuir para o entendimento das diferenças individuais do TEPT (YEHUDA; ANTELMAN, 1993; YEHUDA; LEDOUX, 2007). Estudos genéticos em pacientes com TEPT revelam um padrão familiar, sugerindo fatores herdáveis que podem estar envolvidos em parte dos endofenótipos associados ao transtorno (AMSTADTER; NUGENT; KOENEN, 2009; MEHTA; BINDER, 2012). Mesmo considerando a variabilidade do *background* genético das populações estudadas, uma implicação importante do Experimento 2 é que diferenças inter-populacionais são desproporcionalmente representadas na vulnerabilidade individual a estressores. Assim, estudos utilizando mais de um fenótipo podem ajudar a delinear a gama de respostas a um estressor relativamente uniforme ao invés de produzir informações sobre um animal “prototípico” combinando observações de grupos que assume-se serem homogêneos (YEHUDA; LEDOUX, 2007). Como corolário, a utilização de animais do fenótipo *longfin* deve produzir efeitos de maior magnitude, o que pode auxiliar na análise de diferenças intra-populacionais (i.e., diferenças individuais através da aplicação de Critérios Comportamentais de Corte) e discriminar efeitos de drogas.

6.3. Hipótese 3: A sensibilização dependente de tempo afeta completamente menos de 30% dos animais expostos e minimamente menos de 20% dos animais

A aplicação de critérios de corte permite a discriminação de diferenças individuais na vulnerabilidade ao estressor em questão. As variáveis de escototaxia e tigmotaxia foram escolhidas por agruparem-se em um mesmo *cluster* em uma análise multivariada de efeitos farmacológicos no teste de preferência por escuridão (MAXIMINO et al., 2014c). Além disso, as duas variáveis se apresentaram mais sensibilizadas em animais do fenótipo *longfin*, utilizado no Experimento 3. A aplicação desses Critérios Comportamentais de Corte revelou que cerca de 25% dos animais expostos apresentaram Resposta Comportamental Extrema (RCE), enquanto 20% dos animais apresentaram Resposta Comportamental Mínima (RCM). Essas incidências replicam experimentos em roedores que utilizaram critérios comportamentais (COHEN; ZOHAR, 2004; COHEN et al., 2004) ou estatísticos (ADAMEC et al., 2012; LEBOW et al., 2012; MITRA; ADAMEC; SAPOLSKY, 2009).

Além da escototaxia e da tigmotaxia, os animais RCE também apresentaram nado errático elevado em relação a controles não-expostos. Esses resultados sugerem que, apesar de não haverem diferenças entre animais *longfin* expostos e não-expostos no nado errático, essa variável é importante para a definição do modelo de TEPT.

A observação de que a tigmotaxia e a avaliação de risco também foram maiores em animais RCM do que controles não-expostos sugere que não se trata somente da ausência de efeito, mas de uma vulnerabilidade diferenciada para a sensibilização dependente de tempo. Os efeitos sobre a avaliação de risco também são ambíguos à luz da literatura com roedores; ratos expostos ao modelo de aprendizagem de medo potencializada pelo estresse e classificados como “afetados” engajam-se menos em comportamentos de avaliação de risco no teste de preferência por escuridão, mas apresentam maior reatividade de sobressalto (LEBOW et al., 2012). Ratos classificados como “resilientes” após estresse predatório apresentam maior avaliação de risco no labirinto em cruz elevado (MITRA; ADAMEC; SAPOLSKY, 2009). Em parte, essas discrepâncias se devem à quantificação desse comportamento nesses trabalhos com roedores, que corrigem a avaliação de risco pelo tempo nas porções menos aversivas dos aparatos. A definição de avaliação de risco utilizada aqui aproxima-se mais daquela

proposta por BLANCHARD *et al.* (BLANCHARD *et al.*, 2011): confrontados com estímulos desconhecidos e potencialmente perigosos (p. ex., o compartimento branco do aquário claro/escuro), os animais orientam-se na direção do estímulo, utilizando os sentidos relevantes para investigá-lo. No paulistinha, a avaliação de risco agrupa-se com o nado errático em um componente separado do tempo no branco e tigmotaxia, e é diminuída por tratamentos ansiolíticos e elevada por tratamentos ansiogênicos (MAXIMINO *et al.*, 2014c). Assim, a elevação na avaliação de risco observada em animais RCE e RCM reforça a hipótese de um estado de ansiedade elevada.

6.4. Hipótese 4: Curso temporal das alterações glutamatérgicas e nitrérgicas após estresse

Após a exposição à SA, os níveis extracelulares de glutamato no telencéfalo se elevaram, depois decrescendo e se elevando novamente somente 30 minutos após o estresse. A origem do glutamato elevado é desconhecida, mas a maior parte dos neurônios glutamatérgicos do telencéfalo de peixes teleósteos se encontra em regiões dorsais (i.e., pálio) (GIASSI *et al.*, 2012; HARVEY-GIRARD *et al.*, 2012; VON TROTHA; VERNIER; BALLY-CUIF, 2014). Dentre essas estruturas, o telencéfalo dorsomedial (Dm) têm sido implicado no comportamento emocional (LAU *et al.*, 2011; PORTAVELLA; TORRES; SALAS, 2004; PORTAVELLA; VARGAS, 2005; PORTAVELLA *et al.*, 2004; VON TROTHA; VERNIER; BALLY-CUIF, 2014), e essa região foi proposta como homóloga à amígdala basolateral de mamíferos (MAXIMINO *et al.*, 2013b) (Tabela 4). Assim, é provável que o Dm tenha grande contribuição na elevação do glutamato extracelular observado imediatamente após a exposição à SA.

O mecanismo pelo qual essa elevação inicial ocorreu é desconhecido. Classicamente, a substância de alarme induz a liberação de cortisol em paulistinhas (MATHURU *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2014; SCHIRMER; JESUTHASAN; MATHURU, 2013); esse pico de cortisol poderia levar à liberação rápida de glutamato, como observado na amígdala de roedores (KARST *et al.*, 2005; LOWY; GAULT; YAMAMOTO, 1993; REZNIKOV *et al.*, 2007; VENERO; BORRELL, 1999). Alternativamente, projeções olfatórias secundárias para o telencéfalo dorsoposterior (Dp) e Dm (GAYOSO *et al.*, 2011) poderiam ativar neurônios glutamatérgicos nessas

regiões, induzindo a liberação desse neurotransmissor.

A ativação de receptores glutamatérgicos no telencéfalo de peixes foi implicada em uma série de fenômenos de aprendizagem e comportamento defensivo. O telencéfalo desses animais expressa todas as isoformas dos receptores NMDA (COX; KUCENAS; VOIGT, 2005) e AMPA (HOPPMANN et al., 2008). Receptores AMPA foram implicados na atividade espontânea observada nas porções anteriores do telencéfalo dorsal e no núcleo entopeduncular (VARGAS; THORSTEINSSON; KARLSSON, 2012), enquanto os receptores NMDA foram implicados na produção de plasticidade sináptica no telencéfalo dorsal (NAM; KIM; LEE, 2004). Antagonistas dos receptores NMDA inibem a aquisição de esquiva inibitória no paulistinha, um efeito que é mediado pela inativação da proteína ERK no telencéfalo (NG et al., 2012). Em *Carassius auratus*, a microinjeção de antagonistas dos receptores NMDA no Dm inibem a aquisição, mas não a consolidação, de respostas de esquiva ativa (XU et al., 2003). Dessa forma, a liberação de glutamato após o estresse pode contribuir para um processo de metaplasticidade em regiões límbicas do paulistinha, de forma similar ao proposto em mamíferos por RAO e colaboradores (RAO et al., 2009).

No mesmo intervalo de tempo, uma elevação no nitrito tecidual foi observada. Limitações da técnica dificultam a definição dos eventos que levaram a esse efeito; no entanto, considerando a elevação no glutamato extracelular nesse momento, é possível especular que o NO produzido pela ativação da cascata NMDA–NOS-1 seja responsável pela maior parte dessa elevação de NO_x^- . Nesse caso, o glutamato liberado após o estresse predatório deve ativar receptores NMDA, levando ao influxo de cálcio e ativação da NOS-1. Em paulistinhas, a ativação de receptores NMDA aumenta a escototaxia e abole a habituação, além de elevar o congelamento e a avaliação de risco na preferência por escuridão; esses efeitos são abolidos pelo pré-tratamento com L-NAME (BARBOSA JR et al., 2012; HERCULANO et al., 2015). Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que a resposta de cardumeamento observada durante a exposição à SA está em parte relacionada a essa cascata.

Os níveis de glutamato e nitrito telencefálicos retornaram ao normal 15 minutos após a exposição. 30 minutos depois, entretanto, tanto o glutamato extracelular quanto os níveis de nitrito voltaram a se elevar. É difícil especular a causa desses eventos. Se,

por um lado, o glutamato extracelular pode interagir com receptores NMDA e re-ativar a via NMDA–NOS-1, o NO também é capaz de induzir a liberação de glutamato (BAL-PRICE; MONEER; BROWN, 2002; MEFFERT; PREMACK; SCHULMAN, 1994; WANG et al., 2014; WATTS et al., 2005), e o peroxinitrito (produto da reação do NO com espécies reativas de oxigênio) inibe a recaptção (TROTTI et al., 1996). No primeiro caso, resta saber a origem da elevação do glutamato. Assumindo a segunda hipótese, a elevação em NO_x^- observada 30 minutos após o estresse pode ser uma consequência do início da transcrição das isoformas da NOS2 (*nos2a* e *nos2b*) estimulada pela SA. No entanto, o curso temporal sugere que esse não é o caso, dado que a produção de NO mediada pela NOS2 ocorre horas depois da estimulação (GUIX et al., 2005).

Os níveis extracelulares de glutamato retornaram ao normal 90 minutos após o estresse, mas os níveis teciduais de nitrito permaneceram elevados. Nesse caso, é pouco provável que essa elevação dependa do glutamato. Esses resultados parecem corroborar o modelo de RAO *et al.* (RAO et al., 2009): a SA induz a liberação intensa de glutamato no telencéfalo límbico do paulistinha, iniciando processos de plasticidade, possivelmente mediados pelo NO. Esses mecanismos, uma vez iniciados, podem continuar durante o período de incubação apesar da restauração dos níveis normais de glutamato após o término do período peritraumático. A manifestação final desse processo é a sensibilização dependente de tempo, possivelmente associada a uma maior responsividade de neurônios de regiões límbicas, como o telencéfalo dorsomedial (Dm).

24 h após a exposição à SA (i.e., em momento equivalente aos testes comportamentais descritos), os níveis teciduais de NO_x^- continuam elevados em relação a controles não-expostos. Esses resultados são semelhantes ao observado em roedores em modelos de TEPT, que apresentam níveis elevados de nitrito no hipocampo após a “incubação” do estresse (HARVEY et al., 2004, 2005; OOSTHUIZEN; WEGENER; HARVEY, 2005). Apesar dos níveis de glutamato não terem sido mensurados nesse intervalo, é pouco provável que permaneçam elevados; assim, os níveis elevados de NO_x^- observados no telencéfalo de animais expostos à SA 24 h após o estresse devem derivar de isoformas da NOS2. A isoforma indutível da NOS produz NO de maneira sustentada após sua transcrição, resultando na formação de espécies oxidativas, na

modulação do estresse oxidativo, e na nitrotirosinação ou *S*-nitrosilação de proteínas (DAVIS et al., 2001; GOULD et al., 2013; GUIX et al., 2005). Além disso, o NO pode promover a metaplasticidade, facilitando ou sensibilizando circuitos telencefálicos envolvidos nas respostas aversivas (FABRI et al., 2014; LISBOA et al., 2015).

Em linhas gerais, portanto, a hipótese 4 (e sua hipótese auxiliar) foi parcialmente confirmada pelo Experimento 4: os níveis teciduais de NO_x^- se elevaram por todo o período pós-estresse, com exceção dos 15 minutos; e os níveis extracelulares de glutamato se elevaram imediatamente após o estresse e 30 minutos após a exposição. Via de regra, entretanto, as elevações do glutamato foram fásicas, enquanto as elevações de NO_x^- foram tônicas, conforme previsto pela hipótese 4.

6.5 Hipótese 5: A sensibilização dependente de tempo se deve às alterações na função nitrérgica ocorridas no período posterior ao estresse

As elevações nos níveis de glutamato e nitrito sugerem participação na sensibilização dependente de tempo observada nos Experimentos 1-3. Essa sugestão culminou na Hipótese 5, que testou o papel do NO nesses períodos.

O pré-tratamento com L-NAME não bloqueou a sensibilização dependente de tempo após exposição à SA. Esses resultados sugerem que o “tônus” NOérgico presente *antes* da apresentação do estressor não influencia a resposta ao estresse nesses animais. Em conjunto com os resultados do Experimento 4, esses resultados sugerem que a exposição ao estressor eleva os níveis de NO de forma dependente de glutamato, e que essa elevação inicia os processos subsequentes que ocorrem durante a incubação. O pré-tratamento com L-NAME também não produz efeitos amnésicos na esquiiva ativa em peixes (XU et al., 2007, 2009), sugerindo que o NO não tem papel permissivo nas modificações de longo prazo de respostas aversivas. Em roedores, a iniciação, mas não a consolidação, das respostas sensibilizadas após estresse predatório depende de receptores NMDA (BLUNDELL; ADAMEC; BURTON, 2005), o que também é observado na aprendizagem aversiva em peixes (XU et al., 2003, 2007). Experimentos futuros poderão determinar se a mesma sequência de eventos está envolvida na sensibilização dependente de tempo em paulistinhas.

No Experimento 4, os níveis telencefálicos de NO_x^- também se mostraram

elevados 30 minutos após a exposição à SA. De forma similar, o tratamento com L-NAME nesse intervalo bloqueou a sensibilização da escototaxia e da avaliação de risco, mas não do nado errático ou da tigmotaxia. Em peixes, o tratamento com L-NAME após o treino bloqueia a consolidação da memória de esquiva ativa (XU et al., 2007, 2009), sugerindo participação desse gasotransmissor na consolidação de modificações de longo prazo de respostas aversivas. A atividade NOérgica iniciada após a exposição à SA participa na consolidação das respostas sensibilizadas em paulistinhas. A falta de efeito do L-NAME sobre o nado errático ou a tigmotaxia sugere que as mudanças nessas variáveis são mediadas por mecanismos separados e parcialmente independentes. O nado errático agrupa-se com a avaliação de risco em análise multivariada, enquanto a tigmotaxia agrupa-se com a escototaxia (MAXIMINO et al., 2014c), sugerindo um substrato comum que pode ser diferencialmente afetado pelo sistema NOérgico.

Ainda no Experimento 4, os níveis telencefálicos de NO_x^- permaneceram elevados 90 minutos após a exposição à SA. Curiosamente, o bloqueio das NOS nesse intervalo de tempo não é capaz de bloquear a sensibilização da escototaxia, mas bloqueia a sensibilização da avaliação de risco, nado errático e tigmotaxia. Esses resultados sugerem que o NO opera na consolidação em diferentes cursos temporais e através de diferentes mecanismos. Assim, a sensibilização da escototaxia pelo sistema NOérgico apresenta uma janela mais “curta”, ocorrendo nos primeiros momentos após o evento traumático; a sensibilização das outras variáveis parece se estender por uma janela mais longa, e o intervalo de 90 minutos após o estresse é crítico para a sensibilização do nado errático e da tigmotaxia.

Os mecanismos neurais da contribuição do NO aos efeitos sensibilizados da SA são desconhecidos, e podem não se limitar ao telencéfalo límbico; ainda assim, os resultados dos Experimentos 4 e 5 sugerem alguns mecanismos. A sinalização glutamatérgica na amígdala basolateral (homóloga ao Dm em mamíferos) tem papel importante na iniciação dos efeitos de longo prazo do estresse predatório em roedores (ADAMEC; BLUNDELL; BURTON, 2005; BLUNDELL; ADAMEC; BURTON, 2005; BLUNDELL; ADAMEC, 2007). Essa sinalização não se sustenta por todo o período de incubação; apesar dos níveis de glutamato voltarem ao normal após um período de tempo, a ativação da via NMDA-NO inicia eventos de metaplasticidade que

devem, em última instância, aumentar a responsividade dessas regiões a estímulos estressores (RAO et al., 2009). Elevações sustentadas na transmissão NOérgica também parecem estar envolvidos na sensibilização dependente de tempo em roedores (HARVEY et al., 2004, 2005). O sistema NOérgico da amígdala/Dm também está envolvido no condicionamento aversivo em peixes e roedores (OTA et al., 2008; XU et al., 2009), e uma via NO-GMPc aumenta a excitabilidade de neurônios nessa região em roedores (OTA et al., 2008). Assim, os resultados sugerem que o NO pode facilitar mudanças de longo prazo na função do telencéfalo límbico, resultando em responsividade aumentada a estímulos estressores. Se circuitos diferentes dentro de uma mesma estrutura (p. ex., neurônios glutamatérgicos vs. GABAérgicos no Dm) ou se regiões diferentes estão envolvidas (p. ex., Dm vs. Dl) nos efeitos sobre escototaxia e avaliação de risco, por um lado, e nado errático e tigmotaxia, por outro, é base para investigação futura.

7. Conclusões

- Em animais do fenótipo *shortfin*, a exposição à substância de alarme sensibiliza o comportamento tipo-ansiedade e produz hiperexcitabilidade em animais testados 24 h após o estresse;
- A preferência por escuridão é mais sensibilizada em animais do fenótipo *longfin* do que do fenótipo *shortfin*;
- A aplicação de Critérios Comportamentais de Corte demonstra diferenças individuais na responsividade de animais da linhagem *longfin*;
- A substância de alarme eleva o glutamato extracelular no telencéfalo 0 e 30 minutos após exposição;
- Os níveis teciduais de nitrito são elevados 0, 30 e 90 minutos e 24 horas após exposição à substância de alarme;
- O NO e/ou seus metabólitos estão envolvidos na consolidação, mas não na iniciação da sensibilização dependente de tempo.

Referências

ABRAHAM, W. C. Metaplasticity: Tuning synapses and networks for plasticity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, p. 387–399, maio 2008.

ADAMEC, R. Does long-term potentiation in periaqueductal gray (PAG) mediate lasting changes in rodent anxiety-like behavior (ALB) produced by predator stress? -- Effects of low frequency stimulation (LFS) of PAG on place preference and changes in ALB produced by pr. **Behavioural Brain Research**, v. 120, p. 111–135, 2001.

ADAMEC, R. et al. Prophylactic and therapeutic effects of acute systemic injections of EMD 281014, a selective serotonin 2A receptor antagonist on anxiety induced by predator stress in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 504, p. 79–96, nov. 2004.

ADAMEC, R.; BARTOSZYK, G. D.; BURTON, P. Effects of systemic injections of vilazodone, a selective serotonin reuptake inhibitor and serotonin 1A receptor agonist, on anxiety induced by predator stress in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 504, p. 65–77, 2004.

ADAMEC, R. E. Transmitter systems involved in neural plasticity underlying increased anxiety and defense-implications for understanding anxiety following traumatic stress. **Neuroscience & Biobehavioral**, v. 21, p. 755–765, 1997.

ADAMEC, R. E. et al. Neural plasticity, neuropeptides and anxiety in animals – Implications for understanding and treating affective disorder following traumatic stress in humans. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 301–318, 1998.

ADAMEC, R. E. Evidence that long-lasting potentiation of amygdala efferents in the right hemisphere underlies pharmacological stressor (FG-7142) induced lasting increases in anxiety-like behaviour: Role of GABA tone in initiation of brain and behavioural changes. **Journal of Psychopharmacology**, v. 14, p. 323–339, 2000a.

ADAMEC, R. E. Evidence that long-lasting potentiation in limbic circuits mediating defensive behaviour in the right hemisphere underlies pharmacological stressor (FG-7142) induced lasting increases in anxiety-like behaviour: Role of benzodiazepine receptors. **Journal of Psychopharmacology**, v. 14, p. 307–322, 2000b.

ADAMEC, R. E. et al. Involvement of noradrenergic and corticoid receptors in the consolidation of the lasting anxiogenic effects of predator stress. **Behavioural Brain Research**, v. 179, p. 192–207, 2007.

ADAMEC, R. E. et al. Dendritic morphology of amygdala and hippocampal neurons in more and less predator stress responsive rats and more and less spontaneously anxious

handled controls. **Behavioural Brain Research**, v. 226, p. 133–146, 2012.

ADAMEC, R. E.; BLUNDELL, J.; BURTON, P. Phosphorylated cyclic AMP response element binding protein expression induced in the periaqueductal gray by predator stress: Its relationship to the stress experience, behavior and limbic neural plasticity. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 27, p. 1243 – 1267, 2003.

ADAMEC, R. E.; BLUNDELL, J.; BURTON, P. Relationship of the predatory attack experience to neural plasticity, pCREB expression and neuroendocrine response. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 30, p. 356–375, 2006.

ADAMEC, R. E.; BLUNDELL, J.; COLLINS, A. Neural plasticity and stress induced changes in defense in the rat. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 721–744, 2002.

ADAMEC, R. E.; BLUNDELL, J. J.; BURTON, P. Role of NMDA receptors in the lateralized potentiation of amygdala afferent and efferent neural transmission produced by predator stress. **Physiology & Behavior**, v. 86, p. 75–91, set. 2005.

ADAMEC, R. E.; FOUGERE, D.; RISBROUGH, V. CRF receptor blockade prevents initiation and consolidation of stress effects on affect in the predator stress model of PTSD. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 13, p. 747–757, 2010.

ADAMEC, R. E.; HEBERT, M.; BLUNDELL, J. Long lasting effects of predator stress on pCREB expression in brain regions involved in fearful and anxious behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 221, p. 118–133, 2011.

ADAMEC, R. E.; HOLMES, A.; BLUNDELL, J. Vulnerability to lasting anxiogenic effects of brief exposure to predator stimuli: Sex, serotonin and other factors - Relevance to PTSD. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 32, p. 1287–1292, 2008.

ADAMEC, R. E.; SHALLOW, T.; BUDGELL, J. Blockade of CCK(B) but not CCK(A) receptors before and after the stress of predator exposure prevents lasting increases in anxiety-like behavior: Implications for anxiety associated with posttraumatic stress disorder. **Behavioral Neuroscience**, v. 111, p. 435–449, 1997.

AGETSUMA, M. et al. The habenula is crucial for experience-dependent modification of fear responses in zebrafish. **Nature Neuroscience**, v. 13, p. 1354–1356, 2010.

AHMAD, F.; RICHARDSON, M. K. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: Impact of environmental complexity. **Behavioural Processes**, v. 92, p. 88–98, 2013.

- AHMED, O.; SEGUIN, D.; GERLAI, R. An automated predator avoidance task in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 216, p. 166–171, 2011.
- AHMED, T. S.; FERNANDES, Y.; GERLAI, R. Effects of animated images of sympatric predators and abstract shapes on fear responses in zebrafish. **Behaviour**, v. 149, p. 1125–1153, 2012.
- ALDERMAN, S. L.; BERNIER, N. J. Localization of corticotropin-releasing factor, urotensin I, and CRF-binding protein gene expression in the brain of the zebrafish, *Danio rerio*. **Journal of Comparative Neurology**, v. 502, p. 783–793, 2007.
- ALDERMAN, S. L.; VIJAYAN, M. M. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in zebrafish brain: A functional role in hypothalamus-pituitary-interrenal axis regulation. **Journal of Endocrinology**, v. 215, p. 393–402, 2011.
- ALSOP, D.; VIJAYAN, M. The zebrafish stress axis: Molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event. **General and Comparative Endocrinology**, v. 161, 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, p. R711–R719, 2011.
- ALURU, N.; VIJAYAN, M. M. Stress transcriptomics in fish: A role for genomic cortisol signaling. **General and Comparative Endocrinology**, v. 164, p. 142–50, 2009.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - DSM-III**. Terceira e ed. Washington: American Psychiatric Association, 1980.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - Fifth Edition - DSM-5**. 5th. ed. Washington: American Psychiatric Publishing, 2013.
- AMSTADTER, A. B.; NUGENT, N. R.; KOENEN, K. C. Genetics of PTSD: Fear conditioning as a model for future research. **Psychiatric Annals**, v. 39, p. 358–367, 2009.
- ANDREKI, P.; CHILCOAT, H.; BRESLAU, N. Post-traumatic stress disorder and somatization symptoms: A prospective study. **Psychiatry Research**, v. 79, p. 131–138, 1998.
- AOKI, R.; TSUBOI, T.; OKAMOTO, H. Y-maze avoidance: An automated and rapid associative learning paradigm in zebrafish. **Neuroscience Research**, v. 91, p. 69–72, 2015.

- ARAÚJO, J. et al. Behavioral and pharmacological aspects of anxiety in the light/dark preference test. In: KALUEFF, A. V; STEWART, A. M. (Eds.). . **Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research**. New York: Humana Press, 2012.
- BACHMANN, A. W. et al. Glucocorticoid receptor polymorphisms and post-traumatic stress disorder. **Psychoneuroendocrinology**, v. 30, p. 297–306, abr. 2005.
- BAL-PRICE, A.; MONEER, Z.; BROWN, G. C. Nitric oxide induces rapid, calcium-dependent release of vesicular glutamate and ATP from cultured rat astrocytes. **Glia**, v. 40, p. 312–323, 2002.
- BARBA-ESCOBEDO, P. A.; GOULD, G. G. Visual social preferences of lone zebrafish in a novel environment: Strain and anxiolytic effects. **Genes, Brain and Behavior**, v. 11, p. 366–373, 2012.
- BARBOSA JR, A. et al. Rapid method for acute intracerebroventricular injection in adult zebrafish. In: **Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research**. New Jersey: Humana Press, 2012. p. 323–330.
- BARCELLOS, L. J. G. et al. Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with a predator in zebrafish, *Danio rerio*. **Aquaculture**, v. 272, p. 774–778, 2007.
- BASS, S. L. S.; GERLAI, R. Zebrafish (*Danio rerio*) responds differentially to stimulus fish: The effects of sympatric and allopatric predators and harmless fish. **Behavioural Brain Research**, v. 186, p. 107–117, 2008.
- BAXENDALE, S. et al. Identification of compounds with anti-convulsant properties in a zebrafish model of epileptic seizures. **Disease Models & Mechanisms**, v. 5, p. 773–784, 2012.
- BEIJAMINI, V. et al. Role of nitric oxide in brain regions related to defensive reactions. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 1313–1322, 2005.
- BEIJAMINI, V.; GUIMARÃES, F. S. Activation of neurons containing the enzyme nitric oxide synthase following exposure to an elevated plus maze. **Brain Research Bulletin**, v. 69, p. 347–355, 2006.
- BENCAN, Z.; SLEDGE, D.; LEVIN, E. D. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 94, p. 75–80, 2009.
- BEST, J. D. et al. Non-associative learning in larval zebrafish. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 1206–1215, 2008.
- BLACK, D. W.; GRANT, J. E. **DSM-5 Guidebook. The essential companion to the**

Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing, 2014.

BLANCHARD, D. C. et al. Risk assessment as an evolved threat detection and analysis process. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, p. 991–998, 2011.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: Some reflections on stress and emotion. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 27, p. 1177–1185, 2003.

BLANK, M. et al. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: Rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 92, n. 4, p. 529–534, 2009.

BLASER, R. E.; CHADWICK, L.; MCGINNIS, G. C. Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 208, p. 56–62, 2010.

BLASER, R. E.; PEÑALOSA, Y. M. Stimuli affecting zebrafish (*Danio rerio*) behavior in the light / dark preference test. **Physiology & Behavior**, v. 104, p. 831–837, 2011.

BLASER, R. E.; VIRA, D. G. Experiments on learning in zebrafish (*Danio rerio*): A promising model of neurocognitive function. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 42C, p. 224–231, 2014.

BLECHERT, J. et al. Fear conditioning in posttraumatic stress disorder: Evidence for delayed extinction of autonomic, experiential, and behavioural responses. **Behaviour Research and Therapy**, v. 45, p. 2019–2033, 2007.

BLUNDELL, J. et al. Block of glucocorticoid synthesis during re-activation inhibits extinction of an established fear memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 95, p. 453–460, maio 2011.

BLUNDELL, J.; ADAMEC, R. E. The NMDA receptor antagonist CPP blocks the effects of predator stress on pCREB in brain regions involved in fearful and anxious behavior. **Brain Research**, v. 36, p. 59–76, 2007.

BLUNDELL, J.; ADAMEC, R. E.; BURTON, P. Role of NMDA receptors in the syndrome of behavioral changes produced by predator stress. **Physiology & Behavior**, v. 86, p. 233–243, 2005.

BONAN, C. D.; NORTON, W. H. J. The utility of zebrafish as a model for behavioural genetics. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 2, p. 34–38, 2015.

BORGES NETO, J. B. Os neurotransmissores. In: DE MELLO, M. F.; FIKS, J. P. (Eds.). **Transtorno de Estresse Pós-Traumático. Violência, Medo e Trauma no**

Brasil. São Paulo: Atheneu, 2011. p. 49–64.

BRAFORD, M. R. Stalking the everted telencephalon: Comparisons of forebrain organization in basal ray-finned fishes and teleosts. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 74, p. 56–76, 2009.

BREDT, D. S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. **Free radical research**, v. 31, p. 577–596, 1999.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Nitric Oxide: A physiologic messenger molecule. **Annual Review of Biochemistry**, v. 63, p. 175–195, 1994.

BRENNAN, C. H.; PARKER, M. O. Zebrafish (*Danio rerio*) models of substance abuse: Harnessing the capabilities. **Behaviour**, v. 149, n. 10-12, p. 1037–1062, jan. 2012.

BREWIN, C. R.; DALGLEISH, T.; JOSEPH, S. A dual representation theory of PTSD. **Psychological Review**, v. 103, p. 670–686, 1996.

BREWIN, C. R.; HOLMES, E. A. Psychological theories of posttraumatic stress disorder. **Clinical Psychology Review**, v. 23, p. 339–376, 2003.

BROGLIO, C.; SALAS, C. Hallmarks of a common forebrain vertebrate plan: Specialized pallial areas for spatial, temporal and emotional memory in actinopterygian fish. v. 66, p. 277–281, 2005.

BROWN, G. E. et al. Ostariophysan alarm pheromones: Laboratory and field tests of the functional significance of nitrogen oxides. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, p. 139–154, 2000.

BURGESS, H. A.; GRANATO, M. Sensorimotor gating in larval zebrafish. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 18, p. 4984–94, maio 2007.

BURGOS, J. S.; ALFARO, J. M.; RIPOLL-GÓMEZ, J. Kainate administered to adult zebrafish causes seizures similar to those in rodent models. **European Journal of Neuroscience**, v. 33, p. 1252–1255, 2011.

BUTLER, A. B.; HODOS, W. **Comparative Vertebrate Neuroanatomy. Evolution and Adaptation**. Second Edi ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc, 2005.

CACHAT, J. et al. Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior. **PLoS ONE**, v. 6, p. e17597, 2011a.

CACHAT, J. M. et al. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. **Nature Protocols**, v. 5, p. 1786–1799, 2010.

CACHAT, J. M. et al. Modelling stress and anxiety in zebrafish. In: KALUEFF, A. V;

CACHAT, J. M. (Eds.). . **Zebrafish Models in Neurobehavioral Research**. Nova Iorque: Humana Press, 2011b. p. 73–88.

CALABRESE, V. et al. Redox regulation of heat shock protein expression by signaling involving nitric oxide and carbon monoxide: Relevance to brain aging, neurodegenerative disorders, and longevity. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, p. 444–477, 2006.

CALIXTO, A. V et al. Nitric oxide involvement and neural substrates of the conditioned and innate fear as evaluated in the T-maze test in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 189, p. 341–349, 2008.

CÂMARA FILHO, J. W. S.; SOUGEY, E. B. Transtorno de estresse pós-traumático: Formulação diagnóstica e questões sobre comorbidade. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, p. 221–228, 2001.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE. **CCAC guidelines on: The care and use of fish in research, teaching and testing**. [s.l.: s.n.].

CARAMILLO, E. M. et al. Modeling PTSD in the zebrafish: Are we there yet? **Behavioural Brain Research**, 2014.

CHAKRAVARTY, S. et al. Chronic unpredictable stress (CUS)-induced anxiety and related mood disorders in a zebrafish model: Altered brain proteome profile implicates mitochondrial dysfunction. **PLoS ONE**, v. 8, p. e63302, 2013.

CHANIN, S. et al. Assessing startle responses and their habituation in adult zebrafish. **Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research, Neuromethods**, v. 66, p. 287–300, 2012.

CHIAVEGATTO, S.; NELSON, R. J. Interaction of nitric oxide and serotonin in aggressive behavior. **Hormones and Behavior**, v. 44, p. 233–241, 2003.

CHOI, J.-S.; CAIN, C. K.; LEDOUX, J. E. The role of amygdala nuclei in the expression of auditory signaled two-way active avoidance in rats. **Learning & Memory**, v. 17, p. 139–47, 2010.

CLARK, K. J.; BOCZEK, N. J.; EKKER, S. C. Stressing zebrafish for behavioral genetics. **Reviews in the Neurosciences**, v. 22, p. 49–62, 2011.

CLAY, R. et al. Glucocorticoids are required for extinction of predator stress-induced hyperarousal. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 96, p. 367–377, 2011.

COHEN, H. et al. Setting apart the affected: The use of behavioral criteria in animal models of post traumatic stress disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, p. 1962–1970, 2004.

- COHEN, H. et al. Animal model for PTSD: From clinical concept to translational research. **Neuropharmacology**, v. 62, p. 715–724, 2012.
- COHEN, H.; ZOHAR, J. An animal model of posttraumatic stress disorder: The use of cut-off behavioral criteria. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1032, p. 167–178, 2004.
- COLLIER, A. D. et al. Zebrafish and conditioned place preference: A translational model of drug addiction. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, 2014.
- CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - CONCEA. **Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos - DBCA**. Brasília: [s.n.].
- COX, J. A.; KUCENAS, S.; VOIGT, M. M. Molecular characterization and embryonic expression of the family of N-methyl-D-aspartate receptor subunit genes in the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 234, p. 756–766, 2005.
- DAHLBOM, S. J. et al. Aggression and monoamines: Effects of sex and social rank in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 228, p. 333–338, 2012.
- DAHLBOM, S. J. **Bully or bullied? The zebrafish as a model for social stress and depression**. [s.l.] Uppsala University, 2013.
- DASKALAKIS, N. P.; YEHUDA, R.; DIAMOND, D. M. Animal models in translational studies of PTSD. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, p. 1895–1911, 2013.
- DAVIS, K. L. et al. Novel effects of nitric oxide. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 41, p. 203–236, 2001.
- DAVIS, M. et al. Phasic vs sustained fear in rats and humans: Role of the extended amygdala in fear vs anxiety. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, p. 105–135, 2009.
- DAVIS, M.; SHI, C. The extended amygdala: Are the central nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis differentially involved in fear versus anxiety? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 877, p. 281–291, 1999.
- DE CARVALHO, T. S. **A intensificação do comportamento tipo ansiedade induzido por cafeína em *Danio rerio* (zebrafish) é prevenida pelo tratamento com α -Tocoferol e L-NAME**. [s.l.] Universidade Federal do Pará, 2014.
- DE KLOET, E. R.; JOËLS, M.; HOLSBOER, F. Stress and the brain: From adaptation to disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, p. 463–475, 2005.
- DEAN, R. B.; DIXON, W. J. Simplified statistics for small numbers of observations.

Analytical Chemistry, v. 23, p. 636–638, 1951.

DECARVALHO, T. N. et al. Aversive cues fail to activate fos expression in the asymmetric olfactory-habenula pathway of zebrafish. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 7, p. Article 98, 2013.

DELAHANTY, D. L. et al. Initial urinary epinephrine and cortisol levels predict acute PTSD symptoms in child trauma victims. **Psychoneuroendocrinology**, v. 30, p. 121–128, 2005.

DELAHANTY, D. L.; RAIMONDE, A. J.; SPOONSTER, E. Initial posttraumatic urinary cortisol levels predict subsequent PTSD symptoms in motor vehicle accident victims. **Biological Psychiatry**, v. 48, p. 940–947, 2000.

DEMSKI, L. S. The pallium and mind/behavior relationships in teleost fishes. **Brain, Behavior and Evolution**, v. 82, p. 31–44, 2013.

DI, S. et al. Glucocorticoids regulate glutamate and GABA synapse-specific retrograde transmission via divergent nongenomic signaling pathways. **Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 393–401, 2009.

DOS SANTOS, B. R. **Validação farmacológica da esquiva inibitória do *Danio rerio***. [s.l.] Universidade Federal do Pará, 2013.

DØVING, K. B.; LASTEIN, S. The alarm reaction in fishes — Odorants, modulations of responses, neural pathways. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1170, p. 413–423, 2009.

DREW, R. E. et al. Brain transcriptome variation among behaviorally distinct strains of zebrafish (*Danio rerio*). **BMC Genomics**, v. 13, p. 323, 2012.

DUONG, W. Q. **Behavioral plasticity in the Zebrafish C-start (escape) response**. [s.l.] University of California at Los Angeles, 2012.

EATON, R. C.; LEE, R. K. K.; FOREMAN, M. B. The Mauthner cell and other identified neurons of the brainstem escape network of fish. v. 63, p. 467–485, 2001.

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

ELLIS, L. D.; SEIBERT, J.; SOANES, K. H. Distinct models of induced hyperactivity in zebrafish larvae. **Brain Research**, v. 1449, p. 46–59, 2012.

ELLIS, L. D.; SOANES, K. H. A larval zebrafish model of bipolar disorder as a screening platform for neuro-therapeutics. **Behavioural Brain Research**, v. 233, p. 450–457, 2012.

- ENGESZER, R. E.; RYAN, M. J.; PARICHY, D. M. Learned social preference in zebrafish. **Current Biology**, v. 14, p. 881–884, 2004.
- ETKIN, A.; WAGER, T. D. Functional neuroimaging of anxiety: A meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. **American Journal of Psychiatry**, v. 164, p. 1476–1488, 2007.
- FABRI, D. R. S. S. et al. The expression of contextual fear conditioning involves activation of a NMDA receptor-nitric oxide-cGMP pathway in the dorsal hippocampus of rats. **European Neuropsychopharmacology**, v. 24, p. 1676–1686, 2014.
- FERRADA-NOLI, M. et al. Suicidal behaviour after severe trauma. Part 1: PTSD diagnosis, psychiatric comorbidity and assessments of suicidal behaviour. **Journal of Trauma and Stress**, v. 11, p. 103–112, 1998.
- FOGAÇA, M. V et al. Fine-tuning of defensive behaviors in the dorsal periaqueductal gray by atypical neurotransmitters. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, p. 357–365, 2012.
- FUZZEN, M. L. M.; VAN DER KRAAK, G.; BERNIER, N. J. Stirring up new ideas about the regulation of the hypothalamic-pituitary-interrenal axis in zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish**, v. 7, p. 349–358, 2010.
- GABBAY, V. et al. Epidemiological aspects of PTSD in children and adolescents. In: SILVA, R. R. (Ed.). **Posttraumatic Stress Disorder in Children and Adolescents: Handbook**. Nova Iorque: Norton, 2004. p. 1–17.
- GAIKWAD, S. et al. Acute stress disrupts performance of zebrafish in the cued and spatial memory tests : The utility of fish models to study stress-memory interplay. **Behavioural Processes**, v. 87, n. 2, p. 224–230, 2011.
- GANZ, J. et al. Subdivisions of the adult zebrafish subpallium by molecular marker analysis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 520, p. 633–655, 2012.
- GANZ, J. et al. Subdivisions of the adult zebrafish pallium by molecular marker analysis. **F1000 Research**, v. 3, p. 308, 2014.
- GARTHWAITE, J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 2783–2802, 2008.
- GARTHWAITE, J.; BOULTON, C. L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Annual Review of Physiology**, v. 57, p. 683–706, jan. 1995.
- GAUTRAIS, J. et al. Deciphering interactions in moving animal groups. **PLoS Computational Biology**, v. 8, p. e1002678, 2012.

GAYOSO, J. Á. et al. Differential bulbar and extrabulbar projections of diverse olfactory receptor neuron populations in the adult zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Comparative Neurology**, v. 519, p. 247–276, 2011.

GERLAI, R. et al. Drinks like a fish: Zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 67, p. 773–782, 2000.

GERLAI, R. et al. Acute and chronic alcohol dose: Population differences in behavior and neurochemistry of zebrafish. **Genes, Brain, and Behavior**, v. 8, p. 586–599, ago. 2009.

GERLAI, R. High-throughput behavioral screens: The first step towards finding genes involved in vertebrate brain function using zebrafish. **Molecules**, v. 15, p. 2609–2622, 2010a.

GERLAI, R. Zebrafish antipredatory responses: A future for translational research? **Behavioural Brain Research**, v. 207, p. 223–231, 2010b.

GERLAI, R. Antipredatory behavior of zebrafish: Adaptive function and a tool for translational research. **Evolutionary Psychology**, v. 11, p. 591–605, 2013.

GERLAI, R. Social behavior of zebrafish: From synthetic images to biological mechanisms of shoaling. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 234, p. 59–65, 2014a.

GERLAI, R. Fish in behavior research: Unique tools with a great promise! **Journal of Neuroscience Methods**, abr. 2014b.

GERLAI, R.; FERNANDES, Y.; PEREIRA, T. Zebrafish (*Danio rerio*) responds to the animated image of a predator: Towards the development of an automated aversive task. **Behavioural Brain Research**, v. 201, p. 318–324, 2009.

GHISLENI, G. et al. The role of CRH in behavioral responses to acute restraint stress in zebrafish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 36, p. 176–182, 2012.

GIASSI, A. C. C. et al. Organization of the gymnotiform fish pallium in relation to learning and memory: I. Cytoarchitectonics and cellular morphology. **Journal of Comparative Neurology**, v. 520, p. 3314–3337, 2012.

GIRALDEZ-PEREZ, R. M. et al. Distribution of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase reactivity in the central nervous system of the goldfish (*Carassius auratus*). **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 35, p. 12–32, 2008a.

GIRALDEZ-PEREZ, R. M. et al. Distribution of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase reactivity in the central nervous system of the goldfish (*Carassius auratus*). v.

35, p. 12–32, 2008b.

GLAS, G. A conceptual history of anxiety and depression. In: KASPER, S.; DEN BOER, J. A.; AD SITSEN, J. M. (Eds.). . **Handbook of Depression and Anxiety: Second Edition, Revised and Expanded**. Segunda ed ed.Nova Iorque: Marcel Dekker, Inc., 2003. p. 1–47.

GOODSON, J. L.; KINGSBURY, M. A. What's in a name? Considerations of homologies and nomenclature for vertebrate social behavior networks. **Hormones and Behavior**, v. 64, n. 1, p. 103–112, 2013.

GOSWAMI, S. et al. Impact of predatory threat on fear extinction in Lewis rats. **Learning & Memory**, v. 17, p. 494–501, 2010.

GOSWAMI, S. et al. Animal models of post-traumatic stress disorder: Face validity. **Frontiers in Neuroscience**, v. 7, p. Article 89, 2013.

GOULD, N. et al. Regulation of protein function and signaling by reversible cysteine S-nitrosylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, p. 26473–26479, 2013.

GRAEFF, F. G. Bases biológicas do transtorno de estresse pós-traumático. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, p. 21–24, 2003.

GREEN, J. et al. Automated high-throughput neurophenotyping of zebrafish social behavior. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 210, p. 266–271, set. 2012.

GRIESS, J. P. On a new series of bodies in which nitrogen is substituted for hydrogen. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 154, p. 667–731, 1864.

GRIFFITHS, B. B. et al. A zebrafish model of glucocorticoid resistance shows serotonergic modulation of the stress response. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 6, p. Article 68, 2012.

GRILLON, C. Models and mechanisms of anxiety: Evidence from startle studies. **Psychopharmacology**, v. 199, p. 421–437, 2008.

GUIX, F. X. et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Progress in Neurobiology**, v. 76, p. 126–152, 2005.

GUPTA, P. et al. Assessment of locomotion behavior in adult Zebrafish after acute exposure to different pharmacological reference compounds. **Drug Development and Therapeutics**, v. 5, p. 127–133, 2014.

HAGENAARS, M. A.; OITZL, M.; ROELOFS, K. Updating freeze: Aligning animal and human research. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 47, p. 165–176, 2014.

HALL, D.; SUBOSKI, M. D. Visual and olfactory stimuli in learned release of alarm

reactions by zebra danio fish (*Brachydanio rerio*). **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 63, p. 229–240, 1995.

HARTLEY, C. A.; PHELPS, E. A. Changing fear: The neurocircuitry of emotion regulation. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, p. 136–146, 2009.

HARVEY, B. H. et al. Stress-restress evokes sustained iNOS activity and altered GABA levels and NMDA receptors in rat hippocampus. **Psychopharmacology**, v. 175, p. 494–502, 2004.

HARVEY, B. H. et al. Involvement of the NMDA receptor, NO-cyclic GMP and nuclear factor κ B in an animal model of repeated trauma. **Human Psychopharmacology**, v. 20, p. 367–373, 2005.

HARVEY-GIRARD, E. et al. Organization of the gymnotiform fish pallium in relation to learning and memory: IV. Expression of conserved transcription factors and implications for the evolution of dorsal telencephalon. **Journal of Comparative Neurology**, v. 520, p. 3395–3413, 2012.

HELZER, J. E.; ROBINS, J. N.; MCEVOYL. Post-traumatic stress disorder in the general population: Findings of the epidemiologic catchment area survey. **New England Journal of Medicine**, v. 317, p. 1630–1634, 1987.

HERCULANO, A. M. et al. Interactions between serotonin and glutamate-nitric oxide pathways in zebrafish scototaxis. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 129, p. 97–104, 2015.

HERMAN, J. P. Neural control of chronic stress adaptation. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, p. 61, 2013.

HERMAN, J. P.; CULLINAN, W. E. Neurocircuitry of stress: Central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends in Neurosciences**, v. 20, p. 78–84, 1997.

HETRICK, E. M.; SCHOENFISCH, M. H. Analytical chemistry of nitric oxide. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 2, p. 409–433, 2009.

HINTON, D. E.; LEWIS-FERNÁNDEZ, R. The cross-cultural validity of posttraumatic stress disorder: Implications for DSM-5. **Depression and Anxiety**, v. 28, p. 783–801, 2011.

HOLMQVIST, B. et al. Identification and distribution of nitric oxide synthase in the brain of adult zebrafish. **Neuroscience Letters**, v. 292, p. 119–122, 2000.

HOLMQVIST, B.; EBBESSON, L.; ALM, P. Nitric oxide and the zebrafish (*Danio rerio*): Developmental neurobiology and brain neurogenesis. **Advances in**

Experimental Biology, v. 1, p. 229–273, 2007.

HOPPER, R. A.; GARTHWAITE, J. Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation. **Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 11513–11521, 2006.

HOPPMANN, V. et al. Expression of the eight AMPA receptor subunit genes in the developing central nervous system and sensory organs of zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 237, p. 788–799, 2008.

HUETHE, G. The central adaptation syndrome: Psychosocial stress as a trigger for adaptive modification of brain structure and brain function. **Progress in Neurobiology**, v. 48, p. 569–612, 1996.

HUNZIKER, M. H. L. O desamparo aprendido revisitado: Estudos com animais. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 21, p. 131–139, 2005.

IOVINE, M. K.; JOHNSON, S. L. A genetic, deletion, physical, and human homology map of the long fin region on zebrafish linkage group 2. **Genomics**, v. 79, p. 756–759, 2002.

ITZKOWITZ, M.; IOVINE, M. K. Single gene mutations causing exaggerated fins also cause non-genetic changes in the display behavior of male zebrafish. **Behaviour**, v. 144, p. 787–795, 2007.

IZQUIERDO, I. et al. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in Neurosciences**, v. 29, p. 16–25, 2006.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 68, p. 285–316, 1997.

JESUTHASAN, S. J. Fear, anxiety, and control in the zebrafish. **Developmental Neurobiology**, v. 72, p. 395–403, 2011.

JESUTHASAN, S. J.; MATHURU, A. S. The alarm response in zebrafish: Innate fear in a vertebrate genetic model. **Journal of Neurogenetics**, v. 22, p. 211–229, 2008.

JOVANOVIĆ, T.; NORRHOLM, S. D. Neural mechanisms of impaired fear inhibition in posttraumatic stress disorder. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 5, p. Article 44, 2011.

KALUEFF, A. V et al. Time to recognize zebrafish “affective” behavior. **Behaviour**, v. 149, p. 1019–1036, 2012.

KALUEFF, A. V et al. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and

beyond. **Zebrafish**, v. 10, p. 70–86, 2013.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, p. 63–75, 2014.

KARL, A. et al. A meta-analysis of structural brain abnormalities in PTSD. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 30, p. 1004–1031, 2006.

KARST, H. et al. Mineralocorticoid receptors are indispensable for nongenomic modulation of hippocampal glutamate transmission by corticosterone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 19204–19207, 2005.

KESSLER, R. C. et al. Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. **Archives of General Psychiatry**, v. 51, p. 8–19, 1994.

KESSLER, R. C. et al. Posttraumatic stress disorder in the National Comorbidity Survey. **Archives of General Psychiatry**, v. 52, p. 1048–1060, 1995.

KESSLER, R. C. et al. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. **Archives of General Psychiatry**, v. 62, p. 617–627, 2005.

KESSLER, R. C.; USTUN, T. B. **The WHO World Mental Health Surveys: Global perspectives on the epidemiology of mental disorders**. Nova Iorque: Cambridge University Press, 2008.

KEY, B.; DEVINE, C. A. Zebrafish as an experimental model: Strategies for developmental and molecular neurobiology studies. **Methods in Cell Science**, v. 25, p. 1–6, 2003.

KIESEL, A. L. et al. Behavioural syndromes and shoaling: Connections between aggression, boldness and social behaviour in three different *Danios*. **Behaviour**, v. 149, p. 1155–1175, 2012.

KILPATRICK, D. G. et al. National estimates of exposure to traumatic events and PTSD prevalence using DSM-IV and DSM-5 criteria. **Journal of Trauma and Stress**, v. 26, p. 537–547, 2013.

KIM, Y. H. et al. Scopolamine-induced learning impairment reversed by physostigmine in zebrafish. **Neuroscience Research**, v. 67, p. 156–161, 2010.

KINKEL, M. D. et al. Intraperitoneal injection into adult zebrafish. **Journal of Visualized Experiments**, v. 42, p. 2126, 2010.

- KIST, L. W. et al. Acute exposure to microcystin-producing cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* alters adult zebrafish (*Danio rerio*) swimming performance parameters. **Journal of Toxicology**, v. 2011, p. Article ID 280304, 2011.
- KNOX, D. et al. Glucocorticoid receptors and extinction retention deficits in the single prolonged stress model. **Neuroscience**, v. 223, p. 163–73, out. 2012.
- KOOLHAAS, J. M. et al. Single social defeat in male rats induces a gradual but long lasting behavioral change: A model of depression? **Neuroscience Research Communications**, v. 7, p. 35–41, 1990.
- KORN, H.; FABER, D. S. Escape behavior - Brainstem and spinal cord circuitry and function. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 6, p. 826–832, 1996.
- KORN, H.; FABER, D. S. The Mauthner cell half a century later: A neurobiological model for decision-making? **Neuron**, v. 47, p. 13–28, 2005.
- KORNAU, H. C. et al. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. **Science (New York, N.Y.)**, v. 269, n. 5231, p. 1737–1740, 1995.
- KORTE, S. M. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 117–142, 2001.
- KOZLOVSKY, N. et al. Long-term down-regulation of BDNF mRNA in rat hippocampal CA1 subregion correlates with PTSD-like behavioural stress response. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 10, p. 741–758, 2007.
- KOZLOVSKY, N. et al. A distinct pattern of intracellular glucocorticoid-related responses is associated with extreme behavioral response to stress in an animal model of post-traumatic stress disorder. **European Neuropsychopharmacology**, v. 19, p. 759–771, 2009.
- LAINING, K. J. et al. Expression of an inducible nitric oxide synthase gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 23, p. 71–85, 1999.
- LAMING, P. R. Behavioural arousal and its habituation in the squirrel fish, *Holocentrus rufus*: The role of the telecephalon. **Behavioral and Neural Biology**, v. 47, p. 80–104, 1987.
- LAMING, P. R.; SAVAGE, G. E. Physiological changes observed in the goldfish (*Carassius auratus*) during behavioral arousal. **Behavioral and Neural Biology**, v. 29, p. 255–275, 1980.
- 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, p. 2581–2586, 2011.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. **Aquaculture**, v. 269, p. 1–20, 2007.

LÁZARO-MUÑOZ, G.; LEDOUX, J. E.; CAIN, C. K. Sidman instrumental avoidance initially depends on lateral and basal amygdala and is constrained by central amygdala-mediated Pavlovian processes. **Biological Psychiatry**, v. 67, p. 1120–1127, 2011.

LEBOW, M. et al. Susceptibility to PTSD-like behavior is mediated by corticotropin-releasing factor receptor type 2 levels in the bed nucleus of the stria terminalis. **Journal of Neuroscience**, v. 32, p. 6906–6916, maio 2012.

LEDOUX, J. Rethinking the emotional brain. **Neuron**, v. 73, p. 653–676, 2012a.

LEDOUX, J. E. Evolution of human emotion: A view through fear. **Progress in Brain Research**, v. 195, p. 431–442, 2012b.

LEE, S.; RIVIER, C. Interaction between corticotropin-releasing factor and nitric oxide in mediating the response of the rat hypothalamus to immune and non-immune stimuli. **Molecular Brain Research**, v. 57, p. 54–62, 1998.

LEPILLER, S. et al. Comparative analysis of zebrafish *nos2a* and *nos2b* genes. **Gene**, v. 445, p. 58–65, 2009.

LEVIN, E. D.; BENCAN, Z.; CERUTTI, D. T. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. **Physiology & Behavior**, v. 90, p. 54–58, 2007.

LEVINE, S. et al. Physiological and behavioral effects of prior aversive stimulation (preshock) in the rat. **Physiology & behavior**, v. 10, n. 3, p. 467–471, 1973.

LIBERZON, I.; MARTIS, B. Neuroimaging studies of emotional responses in PTSD. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1071, p. 87–109, 2006.

LIMA, M. G. et al. Nocifensive behavior in adult and larval zebrafish. In: KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M. (Eds.). **Zebrafish Protocols for Neurobehavioral Research**. New York: Humana Press, 2012. v. 66.

LIMA, M. G. et al. Nitric oxide as a regulatory molecule in the processing of the visual stimulus. **Nitric Oxide**, v. 36, p. 44–50, 2014.

LINDQUIST, K. A; BARRETT, L. F. A functional architecture of the human brain: Emerging insights from the science of emotion. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 16, p. 533–540, 2012.

LISBOA, S. F. et al. Increased contextual fear conditioning in iNOS knockout mice:

- Additional evidence for the involvement of nitric oxide in stress-related disorders and contribution of the endocannabinoid system. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, p. 1–12, 2015.
- LOWY, M. T.; GAULT, L.; YAMAMOTO, B. K. Adrenalectomy attenuates stress-induced elevations in extracellular glutamate concentrations in the hippocampus. **Journal of Neurochemistry**, v. 61, p. 1957–1960, 1993.
- LUCA, R. M.; GERLAI, R. In search of optimal fear inducing stimuli: Differential behavioral responses to computer animated images in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 226, p. 66–76, 2012.
- MADDOX, S. A.; SCHAFE, G. E.; RESSLER, K. J. Exploring epigenetic regulation of fear memory and biomarkers associated with post-traumatic stress disorder. **Frontiers in Psychiatry**, v. 4, p. Article 62, 2013.
- MAHABIR, S. et al. Maturation of shoaling in two zebrafish strains: A behavioral and neurochemical analysis. **Behavioural Brain Research**, v. 247, p. 1–8, 2013.
- MAIA, T. V. Two-factor theory, the actor-critic model, and conditioned avoidance. **Learning & Behavior**, v. 38, p. 50–67, 2010.
- MAIER, S. F.; ALBIN, R. W.; TESTA, T. J. Failure to learn to escape in rats previously exposed to inescapable shock depends on nature of escape response. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 85, p. 581–592, 1973.
- MANSUR, B. D. M.; DOS SANTOS, B. R.; GOUVEIA JR, A. Efeitos da substância de alarme no teste claro/escuro no Zebrafish, *Danio rerio*. **Biota Amazônia**, v. 4, p. 87–93, 2014.
- MANUEL, R. et al. Inhibitory avoidance learning in zebrafish (*Danio rerio*): Effects of shock intensity and unraveling differences in task performance. **Zebrafish**, v. 11, p. 341–352, 2014a.
- MANUEL, R. et al. Unpredictable chronic stress decreases inhibitory avoidance learning in Tuebingen Long-Fin zebrafish (*Danio rerio* Hamilton): Stronger effects in the resting phase than in the active phase. **Journal of Experimental Biology**, 2014b.
- MARGIS, R. et al. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Revista de Psiquiatria**, v. 25, n. Supl. 1, p. 65–74, 2003.
- MARROW, L. P.; BRAIN, P. F. An evaluation of the use of defeat-induced loss of status in the rat as a model of loss of self-esteem and depression in humans. **Aggressive Behavior**, v. 24, p. 297–305, 1998.
- MATAR, M. A.; ZOHAR, J.; COHEN, H. Translationally relevant modeling of PTSD in

rodents. **Cell and Tissue Research**, v. 354, p. 127–139, 2013.

MATHURU, A. S. et al. Chondroitin fragments are odorants that trigger fear behavior in fish. **Current Biology**, v. 22, p. 538–544, 2012.

MATTOS, P. A psiconeuroendocrinologia. In: DE MELLO, M. F.; FIKS, J. P. (Eds.). . **Transtorno de Estresse Pós-Traumático. Violência, Medo e Trauma no Brasil**. São Paulo: Atheneu, 2011. p. 77–90.

MATUSZEWICH, L. et al. The delayed effects of chronic unpredictable stress on anxiety measures. **Physiology & Behavior**, v. 90, p. 674–681, 2007.

MAXIMINO, C. et al. Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. **Behavioural Brain Research**, v. 214, p. 157–171, 2010a.

MAXIMINO, C. et al. Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. **Behavioural Brain Research**, v. 210, p. 1–7, 2010b.

MAXIMINO, C. et al. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. **Nature Protocols**, v. 5, p. 209–216, 2010c.

MAXIMINO, C. et al. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, p. 624–631, 2011.

MAXIMINO, C. **Parâmetros da escototaxia como modelo comportamental de ansiedade no paulistinha (Danio rerio, Cyprinidae, Pisces)**. [s.l.] Universidade Federal do Pará, 2011a.

MAXIMINO, C. Modulation of nociceptive-like behavior in zebrafish (*Danio rerio*) by environmental stressors. **Psychology & Neuroscience**, v. 4, p. 149–155, 2011b.

MAXIMINO, C. et al. A comparison of the light / dark and novel tank tests in zebrafish. **Behaviour**, v. 149, p. 1099–1123, 2012.

MAXIMINO, C. et al. Behavioral and neurochemical changes in the zebrafish leopard strain. **Genes, Brain and Behavior**, v. 12, p. 576–582, 2013a.

MAXIMINO, C. et al. “Limbic associative” and “autonomic” amygdala in teleosts: A review of the evidence. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 48-49, p. 1–13, 2013b.

MAXIMINO, C. et al. Role of serotonin in zebrafish (*Danio rerio*) anxiety: Relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY 100635, SB 224289, fluoxetine and para-chlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models. **Neuropharmacology**, v. 71, p. 83–97, 2013c.

MAXIMINO, C. et al. Role of nitric oxide in the behavioral and neurochemical effects

of IB-MECA in zebrafish. **Psychopharmacology**, 2014a.

MAXIMINO, C. et al. 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**, v. 124C, p. 425–433, 2014b.

MAXIMINO, C. et al. Fingerprinting of psychoactive drugs in zebrafish anxiety-like behaviors. **PLoS ONE**, v. 9, p. e103943, jan. 2014c.

MCFARLANE, A. C. Epidemiological evidence about the relationship between PTSD and alcohol abuse: The nature of the association. **Addictive Behaviors**, v. 23, p. 813–825, 1998.

MCNEILL, B.; PERRY, S. F. Nitric oxide and the control of catecholamine secretion in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 2421–2431, 2005.

MEFFERT, M. K.; PREMACK, B. A.; SCHULMAN, H. Nitric oxide stimulates Ca²⁺-independent synaptic vesicle release. **Neuron**, v. 12, p. 1235–1244, 1994.

MEHTA, D.; BINDER, E. B. Gene × environment vulnerability factors for PTSD: The HPA-axis. **Neuropharmacology**, v. 62, p. 654–662, mar. 2012.

MILAD, M. R.; QUIRK, G. J. Fear extinction as a model for translational neuroscience: Ten years of progress. **Annual Review of Psychology**, v. 63, p. 129–151, 2012.

MILLER, M. M.; MCEWEN, B. S. Establishing an agenda for translational research on PTSD. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1071, p. 294–312, 2006.

MILLER, N.; GERLAI, R. Quantification of shoaling behaviour in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 184, p. 157–166, 2007.

MITRA, R.; ADAMEC, R. E.; SAPOLSKY, R. Resilience against predator stress and dendritic morphology of amygdala neurons. **Behavioural Brain Research**, v. 205, p. 535–543, 2009.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 47, p. 254–260, 1954.

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**, v. 907, p. 1–6, out. 2012.

MORETZ, J. A.; MARTINS, E. P.; ROBISON, B. D. Behavioral syndromes and the

evolution of correlated behavior in zebrafish. **Behavioral Ecology**, v. 18, p. 556–562, 2007.

MORGANE, P. J.; GALLER, J. R.; MOKLER, D. J. A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. **Progress in Neurobiology**, v. 75, p. 143–160, 2005.

MOTTA, S. C.; CANTERAS, N. S. Restraint stress and social defeat: What they have in common. **Physiology & Behavior**, v. 146, p. 105–110, 2015.

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

MUELLER, T.; GUO, S. The distribution of GAD67-mRNA in the adult zebrafish (teleost) forebrain reveals a prosomeric pattern and suggests previously unidentified homologies to tetrapods. **Journal of Comparative Neurology**, v. 516, n. 6, p. 553–568, 2009.

MUELLER, T.; WULLIMANN, M. F.; GUO, S. Early teleostean basal ganglia development visualized by zebrafish GAD67 gene expression. **Journal of Comparative Neurology**, v. 507, p. 1245–1257, 2008a.

MUELLER, T.; WULLIMANN, M. F.; GUO, S. Early teleostean basal ganglia development visualized by zebrafish *Dlx2a*, *Lhx6*, *Lhx7*, *Tbr2* (*eomesa*), and GAD67 gene expression. **Journal of Comparative Neurology**, v. 507, p. 1245–1257, 2008b.

MUNCK, A. U. et al. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Reviews**, v. 21, p. 55–89, 2000.

MURISON, R.; OVERMIER, J. B. Comparison of different animal models of stress reveals a non-monotonic effect. **Stress**, v. 2, p. 227–230, 1998.

MYERS, B. et al. Central stress-integrative circuits: Forebrain glutamatergic and GABAergic projections to the dorsomedial hypothalamus, medial preoptic area, and bed nucleus of the stria terminalis. **Brain Structure & Function**, 2013.

NAM, R.; KIM, W.; LEE, C. NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the telencephalon of the zebrafish. **Neuroscience Letters**, v. 370, p. 248–251, 2004.

NATIONAL COMORBIDITY SURVEY. **NCS-R appendix tables: Table 1. Lifetime prevalence of DSM-IV/WMH-CIDI disorders by sex and cohort. Table 2. Twelve-month prevalence of DSM-IV/WMH-CIDI disorders by sex and cohort.** [s.l.: s.n.].

NEUMANN, N. F.; FAGAN, D.; BELOSEVIC, M. Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial

lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages.

Developmental and Comparative Immunology, v. 19, p. 473–482, 1995.

NG, M.-C. et al. Effect of MK-801-induced impairment of inhibitory avoidance learning in zebrafish via inactivation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in telencephalon. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 1099–1106, 2012.

NORTON, W.; BALLY-CUIF, L. Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. **BMC neuroscience**, v. 11, p. 90, 2010.

NORTON, W. H. J. et al. Modulation of fgfr1a signaling in zebrafish reveals a genetic basis for the aggression–boldness syndrome. **Journal of Neuroscience**, v. 31, p. 13796–13807, 2011.

NORTON, W. H. J. Toward developmental models of psychiatric disorders in zebrafish. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 7, p. Article 79, 2013.

NOVEJARQUE, A.; LANUZA, E. Two interconnected functional systems in the amygdala of amniote vertebrates. **Brain Research Bulletin**, v. 75, p. 206–213, 2008.

NOVOA, B.; FIGUERAS, A. Zebrafish: Model for the study of inflammation and the innate immune response to infectious diseases. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 946, p. 253–275, 2012.

O’CONNELL, L. A.; HOFMANN, H. A. The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: A comparative synthesis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 519, p. 3599–3639, 2011.

O’CONNOR, T. M.; O’HALLORAN, D. J.; SHANAHAN, F. The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: From molecule to melancholia. **QJM**, v. 93, p. 323–333, 2000.

OLFF, M.; LANGELAND, W.; GERSONS, B. P. R. The psychobiology of PTSD: Coping with trauma. **Psychoneuroendocrinology**, v. 30, p. 974–982, 2005.

OLIVEIRA, R. M. W. DE et al. Expression of neuronal nitric oxide synthase mRNA in stress-related brain areas after restraint in rats. **Neuroscience Letters**, v. 289, p. 123–126, 2000.

OLIVEIRA, R. F. Mind the fish: Zebrafish as a model in cognitive social neuroscience. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 7, p. Article 131, 2013.

OLIVEIRA, T. A. et al. Death-associated odors induce stress in zebrafish. **Hormones and Behavior**, v. 65, p. 340–344, 2014.

OLIVENZA, R. et al. Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide

synthase in rat brain cortex. **Journal of Neurochemistry**, v. 74, p. 785–791, 2000.

OOSTHUIZEN, F.; WEGENER, G.; HARVEY, B. H. Nitric oxide as inflammatory mediator in post-traumatic stress disorder (PTSD): Evidence from an animal model. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 1, p. 109–123, 2005.

OSWALD, M.; ROBISON, B. D. Strain-specific alteration of zebrafish feeding behavior in response to aversive stimuli. **Canadian Journal of Zoology**, v. 86, p. 1085–1094, 2011.

OTA, K. T. et al. The NO-cGMP-PKG signaling pathway regulates synaptic plasticity and fear memory consolidation in the lateral amygdala via activation of ERK / MAP kinase. **Learning & Memory**, v. 15, p. 792–805, 2008.

OVERMIER, J. B. On learned helplessness. **Integrative Physiological & Behavioral Science**, v. 37, p. 4–8, 2002.

OVERMIER, J. B.; LEAF, R. C. Effects of discriminative Pavlovian fear conditioning upon previously or subsequently acquired avoidance responding. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 60, p. 213–217, 1965.

OVERMIER, J. B.; SELIGMAN, M. E. Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 63, p. 28–33, 1967.

PANKSEPP, J. **Affective Neuroscience. The Foundations of Human and Animal Emotions**. Nova Iorque: Oxford University Press, 1998.

PANKSEPP, J. Cross-species affective neuroscience decoding of the primal affective experiences of humans and related animals. **PLoS ONE**, v. 6, p. e21236, 2011.

PARK, C. R. et al. Acute predator stress impairs the consolidation and retrieval of hippocampus-dependent memory in male and female rats. **Learning & Memory**, v. 15, p. 271–280, 2008.

PARRA, K. V.; ADRIAN, J. C.; GERLAI, R. The synthetic substance hypoxanthine 3-N-oxide elicits alarm reactions in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 205, p. 336–341, 2009.

PATEL, K. P.; LI, Y.-F.; HIROOKA, Y. Role of nitric oxide in central sympathetic outflow. **Experimental Biology and Medicine**, v. 226, p. 814–824, 2001.

PAVLIDIS, M. et al. Adaptive changes in zebrafish brain in dominant-subordinate behavioral context. **Behavioural Brain Research**, v. 225, p. 529–37, 2011.

PFAFF, D. W.; MARTIN, E. M.; FABER, D. Origins of arousal: Roles for medullary

- reticular neurons. **Trends in Neurosciences**, v. 35, p. 468–476, ago. 2012.
- PIATO, Â. L. et al. Acute restraint stress in zebrafish: Behavioral parameters and purinergic signaling. **Neurochemical Research**, v. 36, p. 1876–1886, 2011a.
- PIATO, Â. L. et al. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): Behavioral and physiological responses. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, p. 561–567, 2011b.
- POON, K. L. et al. Expression pattern of neuronal nitric oxide synthase in embryonic zebrafish. **Gene Expression Patterns**, v. 3, p. 463–466, 2003.
- POON, K. L.; RICHARDSON, M.; KORZH, V. Expression of zebrafish *nos2b* surrounds oral cavity. **Developmental Dynamics**, v. 237, p. 1662–1667, 2008.
- PORTAVELLA, M. et al. The effects of telencephalic pallial lesions on spatial, temporal, and emotional learning in goldfish. **Brain Research Bulletin**, v. 57, p. 397–399, 2002.
- PORTAVELLA, M. et al. Lesions of the medial pallium, but not of the lateral pallium, disrupt spaced-trial avoidance learning in goldfish (*Carassius auratus*). **Neuroscience Letters**, v. 362, p. 75–78, 2004.
- PORTAVELLA, M.; TORRES, B.; SALAS, C. Avoidance response in goldfish: Emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic pallium. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 2335–2342, 2004.
- PORTAVELLA, M.; VARGAS, J. P. Emotional and spatial learning in goldfish is dependent on different telencephalic pallial systems. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 2800–2806, 2005.
- PRADEL, G.; SCHACHNER, M.; SCHMIDT, R. Inhibition of memory consolidation by antibodies against cell adhesion molecules after active avoidance conditioning in zebrafish. **Journal of Neurobiology**, v. 39, p. 197–206, 1999.
- RAABE, F. J.; SPENGLER, D. Epigenetic risk factors in PTSD and depression. **Frontiers in Psychiatry**, v. 4, p. Article 80, 2013.
- RAIO, C. M.; PHELPS, E. A. The influence of acute stress on the regulation of conditioned fear. **Neurobiology of Stress**, v. 1, p. 134–146, 2015.
- RAO, R. P. et al. PTSD: From neurons to networks. In: SHIROMANI, P. J.; KEANE, T. M.; LEDOUX, J. E. (Eds.). **Post-traumatic Stress Disorder: Basic Science and Clinical Practice**. Nova Iorque: Humana Press, 2009. p. 151–184.
- REUL, J. M. H. M. Making memories of stressful events: A journey along epigenetic,

gene transcription, and signaling pathways. **Frontiers in Psychiatry**, v. 5, p. Article 5, 2014.

REUL, J. M. H. M.; NUTT, D. J. Glutamate and cortisol — A critical confluence in PTSD? **Journal of Psychopharmacology**, v. 22, p. 469–472, 2008.

REZNIKOV, L. R. et al. Acute stress-mediated increases in extracellular glutamate levels in the rat amygdala: Differential effects of antidepressant treatment. **European Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 3109–3114, 2007.

RIHEL, J. et al. Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. **Science**, v. 347, p. 348–351, 2010.

RINKWITZ, S.; MOURRAIN, P.; BECKER, T. S. Zebrafish: An integrative system for neurogenomics and neurosciences. **Progress in Neurobiology**, v. 93, p. 231–243, 2011.

ROBERTS, A. C. et al. Habituation of the C-start response in larval zebrafish exhibits several distinct phases and sensitivity to NMDA receptor blockade. **PLoS ONE**, v. 6, p. e29132, 2011.

ROONEY, D. J.; LAMING, P. R. Effects of telencephalic ablation on habituation of arousal responses, within and between daily training sessions in goldfish. **Behavioral and Neural Biology**, v. 49, p. 83–96, 1988.

RORABACHER, D. B. Statistical treatment for rejection of deviant values: Critical values of Dixon Q parameter and related subrange ratios at the 95 percent confidence level. **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 139–146, 1991.

ROSEMBERG, D. B. et al. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. **PLoS ONE**, v. 6, p. e19397, 2011.

RUIS, M. A. et al. Housing familiar male wildtype rats together reduces the long-term adverse behavioural and physiological effects of social defeat. **Psychoneuroendocrinology**, v. 24, p. 285–300, 1999.

SACKERMAN, J. et al. Zebrafish behavior in novel environments: Effects of acute exposure to anxiolytic compounds and choice of *Danio rerio* line. **International Journal of Comparative Psychology**, v. 23, p. 43–61, 2010.

SALAS, C. et al. Neuropsychology of learning and memory in teleost fish. **Zebrafish**, v. 3, p. 157–71, jan. 2006.

SARTORY, G. et al. In search of the trauma memory: A meta-analysis of functional neuroimaging studies of symptom provocation in posttraumatic stress disorder (PTSD). **PLoS ONE**, v. 8, p. e58150, 2013.

- SAXE, G. N. et al. Dissociative disorders in psychiatric inpatients. **American Journal of Psychiatry**, v. 150, p. 1037–1042, 1993.
- SCHAAF, M. J. M. et al. Discovery of a functional glucocorticoid receptor β -isoform in zebrafish. **Endocrinology**, v. 149, p. 1591–1599, 2008.
- SCHINDELIN, J. et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, p. 676–682, 2012.
- SCHIRMER, A.; JESUTHASAN, S.; MATHURU, A. S. Tactile stimulation reduces fear in fish. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, p. Article 167, 2013.
- SEIBT, K. J. et al. Antipsychotic drugs prevent the motor hyperactivity induced by psychotomimetic MK-801 in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 214, p. 417–422, 2010.
- SELIGMAN, M. E.; MAIER, S. F. Failure to escape traumatic shock. **Journal of Experimental Psychology**, v. 74, p. 1–9, 1967.
- SERRA, E. L.; MEDALHA, C. C.; MATTIOLI, R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 32, p. 1551–1553, 1999.
- SERVATIUS, R. J.; OTTENWELLER, J. E.; NATELSON, B. H. Delayed startle sensitization distinguishes rats exposed to one or three stress sessions: Further evidence towards an animal model of PTSD. **Biological Psychiatry**, v. 38, p. 539–546, 1995.
- SHIN, L. M.; RAUCH, S. L.; PITMAN, R. K. Amygdala, medial prefrontal cortex, and hippocampal function in PTSD. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1071, p. 67–79, 2006.
- SIEGMUND, A.; WOTJAK, C. T. Toward an animal model of post-traumatic stress disorder. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1071, p. 324–334, 2006.
- SMITH, M. E. Bilateral hippocampal volume reduction in adults with post-traumatic stress disorder: A meta-analysis of structural MRI studies. **Hippocampus**, v. 15, p. 798–807, 2005.
- SNYDER, S. H.; JAFFREY, S. R.; ZAKHARY, R. Nitric oxide and carbon monoxide: Parallel roles as neural messengers. **Brain Research Reviews**, v. 26, p. 167–175, 1998.
- SØRENSEN, C.; JOHANSEN, I. B.; ØVERLI, Ø. Neural plasticity and stress coping in teleost fishes. **General and Comparative Endocrinology**, v. 181, p. 25–34, 2013.
- SOUTHWICK, S. M.; YEHUDA, R.; GILLER JR, E. L. Personality disorders in treatment-seeking combat veterans with posttraumatic stress disorder. **American**

Journal of Psychiatry, v. 150, p. 1020–1023, 1993.

SPEEDIE, N.; GERLAI, R. Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 188, p. 168–177, 2008.

SPENCE, R. et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological Reviews**, v. 83, p. 13–34, 2008.

STAM, R. PTSD and stress sensitisation: A tale of brain and body. Part 1: Human studies. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 31, p. 530–557, 2007a.

STAM, R. PTSD and stress sensitisation: A tale of brain and body. Part 2: Animal models. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 31, p. 558–584, 2007b.

STAM, R.; BRUIJNZEEL, A. W.; WIEGANT, V. M. Long-lasting stress sensitisation. **European Journal of Pharmacology**, v. 405, p. 217–224, 2000.

STEENBERGEN, H. L. et al. Sex-dependent effects of inescapable shock administration on shuttlebox-escape performance and elevated plus-maze behavior. **Physiology & Behavior**, v. 48, p. 571–576, 1990.

STEENBERGEN, P. J.; RICHARDSON, M. K.; CHAMPAGNE, D. L. The use of the zebrafish model in stress research. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, n. 6, p. 1432–1451, 2011.

STEPHENSON, J. F.; PARTRIDGE, J. C.; WHITLOCK, K. E. Food and conspecific chemical cues modify visual behavior of zebrafish, *Danio rerio*. **Zebrafish**, v. 9, p. 68–73, jun. 2012.

STEWART, A. et al. Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, n. 6, p. 1421–1431, 2011a.

STEWART, A. et al. Modeling anxiety using adult zebrafish: A conceptual review. **Neuropharmacology**, v. 62, p. 135–143, 2011b.

STEWART, A. et al. Neurophenotyping of adult zebrafish using the light/dark box paradigm. In: KALUEFF, A. V; CACHAT, J. M. (Eds.). **Zebrafish Neurobehavioral Protocols**. New York: Humana Press, 2011c. p. 157–167.

STEWART, A. et al. Zebrafish models to study drug abuse-related phenotypes. **Reviews in the Neurosciences**, v. xx, 2011d.

STEWART, A. M. et al. Understanding spatio-temporal strategies of adult zebrafish exploration in the open field test. **Brain Research**, p. 1–9, 2012.

STEWART, A. M. et al. Perspectives on experimental models of serotonin syndrome in

- zebrafish. **Neurochemistry International**, v. 62, p. 893–902, 2013a.
- STEWART, A. M. et al. Constructing the habituome for phenotype-driven zebrafish research. **Behavioural Brain Research**, v. 236, p. 110–117, 2013b.
- STEWART, A. M. et al. Molecular psychiatry of zebrafish. **Molecular Psychiatry**, 2014a.
- STEWART, A. M. et al. Developing zebrafish models relevant to PTSD and other trauma- and stressor-related disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 2014b.
- STEWART, A. M. et al. Zebrafish models for translational neuroscience research: From tank to bedside. **Trends in Neurosciences**, v. 37, p. 264–278, maio 2014c.
- SUBBIAH, S.; KAR, B. Adult zebrafish as a new animal model to study anxiety. **Asian Journal of Experimental Biological Science**, v. 4, p. 167–171, 2013.
- SUBOSKI, M. D. et al. Alarm reaction in acquisition and social transmission of simulated-predator recognition by zebra danio fish (*Brachydanio rerio*). **Journal of Comparative Psychology**, v. 104, p. 101–112, 1990.
- TELES, M. C. et al. Social modulation of brain monoamine levels in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 253, p. 17–24, 2013.
- TOMS, C. N.; ECHEVARRIA, D. J.; JOUANDOT, D. J. A methodological review of personality-related studies in fish: Focus on the shy-bold axis of behavior. **International Journal of Comparative Psychology**, v. 23, p. 1–25, 2010.
- TRAN, S.; CHATTERJEE, D.; GERLAI, R. An integrative analysis of ethanol tolerance and withdrawal in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, 2014.
- TRAN, S.; GERLAI, R. Individual differences in activity levels in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 257, p. 224–229, 2013a.
- TRAN, S.; GERLAI, R. Time-course of behavioural changes induced by ethanol in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, p. 1–10, 2013b.
- TROTTI, D. et al. Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 5976–5979, 1996.
- VALENTE, A. et al. Ontogeny of classical and operant learning behaviors in zebrafish. **Learning & Memory**, v. 19, p. 170–177, 2012.
- VAN DIJKEN, H. H. et al. Characterization of stress-induced long-term behavioural changes in rats: Evidence in favor of anxiety. **Physiology & Behavior**, v. 52, p. 945–951, 1992a.

VAN DIJKEN, H. H. et al. Inescapable footshocks induce progressive and long-lasting behavioral changes in male rats. **Physiology & Behavior**, v. 51, p. 787–794, 1992b.

VAN DIJKEN, H. H. et al. Effects of anxiolytic and antidepressant drugs on long-lasting behavioural deficits resulting from one short stress experience in male rats. **Psychopharmacology**, v. 109, p. 395–402, dez. 1992c.

VARGAS, J. P.; LÓPEZ, J. C.; PORTAVELLA, M. Amygdala and emotional learning in vertebrates – A Comparative Perspective. In: **The amygdala - A discrete multitasking manager**. [s.l.] InTech, 2012. p. 1–32.

VARGAS, R. et al. The zebrafish brain in research and teaching: A simple in vivo and in vitro model for the study of spontaneous neural activity. **Advances in Physiology Education**, v. 35, p. 188–196, 2013.

VARGAS, R.; THORSTEINSSON, H.; KARLSSON, K. A E. Spontaneous neural activity of the anterodorsal lobe and entopeduncular nucleus in adult zebrafish: A putative homologue of hippocampal sharp waves. **Behavioural Brain Research**, v. 229, n. 1, p. 10–20, 2012.

VENERO, C.; BORRELL, J. Rapid glucocorticoid effects on excitatory amino acid levels in the hippocampus: A microdialysis study in freely moving rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, p. 2465–2473, 1999.

VIGNET, C. et al. Systematic screening of behavioral responses in two zebrafish strains. **Zebrafish**, v. 10, p. 365–75, 2013.

VIRGILI, M. et al. Regional distribution of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase activities in the central nervous system of teleosts. **Brain Research**, v. 901, p. 202–207, 2001.

VÍTEČEK, J. et al. Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase: Therapeutic potential and challenges. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, p. Article ID 318087, 2012.

VON FRISCH, K. Zur psychologie des Fische-Schwarmes. **Naturwissenschaften**, v. 26, p. 601–606, 1938.

VON TROTHA, J. W.; VERNIER, P.; BALLY-CUIF, L. Emotions and motivated behavior converge on an amygdala-like structure in the zebrafish. **The European journal of neuroscience**, ago. 2014.

WANG, H. et al. Conditioned fear stress combined with single-prolonged stress: A new PTSD mouse model. **Neuroscience Research**, v. 73, p. 142–152, 2012.

WANG, R. Two's company, three's a crowd: Can H₂S be the third endogenous gaseous

- transmitter? **FASEB Journal**, v. 16, p. 1792–1798, 2002.
- WANG, S. et al. Nitric oxide facilitates active avoidance learning via enhancement of glutamate levels in the hippocampal dentate gyrus. **Behavioural Brain Research**, v. 271, p. 177–83, set. 2014.
- WANG, T. et al. Molecular cloning, gene organization and expression of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. **Biochemistry Journal**, v. 358, p. 747–755, 2001.
- WATTS, J. et al. Release of arginine, glutamate and glutamine in the hippocampus of freely moving rats: Involvement of nitric oxide. **Brain Research Bulletin**, v. 65, p. 521–528, 2005.
- WESSA, M.; FLOR, H. Failure of extinction of fear responses in posttraumatic stress disorder: Evidence from second-order conditioning. **American Journal of Psychiatry**, v. 164, p. 1684–1692, 2007.
- WESTON, C. S. E. Posttraumatic stress disorder: A theoretical model of the hyperarousal subtype. **Frontiers in Psychiatry**, v. 5, p. Article 37, 2014.
- WHITAKER, A. M.; GILPIN, N. W.; EDWARDS, S. Animal models of post-traumatic stress disorder and recent neurobiological insights. **Behavioural Pharmacology**, v. 25, p. 398–409, 2014.
- WOLF, K. Physiological salines for freshwater teleosts. **Progress in Fish-Culture**, v. 25, p. 135–140, 1963.
- WOLMAN, M. A. et al. Chemical modulation of memory formation in larval zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, p. 15468–15473, 2011.
- WONG, K. et al. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, v. 208, p. 450–457, 2010.
- WONG, R. Y. et al. Comparing behavioral responses across multiple assays of stress and anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). **Behaviour**, v. 149, p. 1205–1240, 2012.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The Tenth Revision of the International Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10)**. Geneva: World Health Organization, 1992.
- WRIGHT, D. et al. Inter and intra-population variation in shoaling and boldness in the zebrafish (*Danio rerio*). **Naturwissenschaften**, v. 90, p. 374–377, 2003.
- WULLIMANN, M. F.; MUELLER, T. Teleostean and mammalian forebrains

contrasted: Evidence from genes to behavior. **Journal of Comparative Neurology**, v. 475, p. 143–162, 2004.

WULLIMANN, M. F.; RINK, E. The teleostean forebrain: A comparative and developmental view based on early proliferation, Pax6 activity and catecholaminergic organization. **Brain Research Bulletin**, v. 57, p. 363–370, 2002.

WULLIMANN, M. F.; RUPP, B.; REICHERT, H. **Neuroanatomy of the zebrafish brain. A topological atlas**. Berlin: Birkhäuser Verlag, 1996.

XU, X. et al. The role of telencephalic NMDA receptors in avoidance learning in goldfish (*Carassius auratus*). **Behavioral Neuroscience**, v. 117, p. 548–554, 2003.

XU, X. et al. Active avoidance conditioning in zebrafish (*Danio rerio*). **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 87, p. 72–77, 2007.

XU, X. et al. The role of telencephalic NO and cGMP in avoidance conditioning in goldfish (*Carassius auratus*). **Behavioral Neuroscience**, v. 123, p. 614–623, 2009.

YAMAMOTO, S. et al. Single prolonged stress: Toward an animal model of posttraumatic stress disorder. **Depression and Anxiety**, v. 26, p. 1110–1117, 2009.

YANG, L.-L. et al. Endotoxin molecule lipopolysaccharide-induced zebrafish inflammation model: A novel screening method for anti-inflammatory drugs. **Molecules**, v. 19, p. 2390–2409, 2014.

YEHUDA, R. Post-traumatic stress disorder. **The New England Journal of Medicine**, v. 346, p. 108–114, 2002.

YEHUDA, R. et al. Epigenetic biomarkers as predictors and correlates of symptom improvement following psychotherapy in combat veterans with PTSD. **Frontiers in Psychiatry**, v. 4, p. Article 118, 2013.

YEHUDA, R.; ANTELMAN, S. M. Criteria for rationally evaluating animal models for posttraumatic stress disorder. **Biological Psychiatry**, v. 33, p. 479–486, 1993.

YEHUDA, R.; LEDOUX, J. E. Response variation following trauma: A translational neuroscience approach to understanding PTSD. **Neuron**, v. 56, p. 19–32, 2007.

ZIV, L. et al. An affective disorder in zebrafish with mutation of the glucocorticoid receptor. n. March, p. 1–11, 2012.

ZOR, T.; SELINGER, Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. **Analytical Biochemistry**, v. 236, p. 302–308, 1996.

Apêndices

Apêndice A: Artigo submetido à revista *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*

Apêndice B: Artigo submetido à revista *Behavioural Brain Research*