

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

***CAMPUS* PASSO FUNDO**

CURSO DE MEDICINA

BRUNO ZILLI PERONI

**INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DA N-ACETIL CISTEÍNA EM UM
MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL EM PEIXES-ZEBRA**

PASSO FUNDO, RS

2025

BRUNO ZILLI PERONI

**INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DA N-ACETIL CISTEÍNA EM UM
MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL EM PEIXES-ZEBRA**

Trabalho de Curso de graduação apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de médico da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Passo Fundo, RS.

Orientador: Prof. Dr. Ricieri Naue Mocelin

PASSO FUNDO, RS

2025

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Peroni, Bruno Zilli

Investigação do mecanismo de ação da N-acetil
cisteína em um modelo de estresse crônico imprevisível
em peixes-zebra / Bruno Zilli Peroni. -- 2025.
58 f.:il.

Orientador: Dr. Ricieri Naue Mocelin

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Medicina, Passo Fundo, RS, 2025.

1. Farmacologia. 2. Glutamato. 3. N-Acetilcisteína.
4. Peixe-Zebra. 5. Psiquiatria. I. Mocelin, Ricieri
Naue, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul.
III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

BRUNO ZILLI PERONI

**INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DA N-ACETIL CISTEÍNA EM UM
MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL EM PEIXES-ZEBRA**

Trabalho de Curso (TC), apresentado ao curso de medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *campus* Passo Fundo, RS, como requisito parcial para obtenção do título de Médico.

Este Trabalho de Curso foi defendido e aprovado pela banca examinadora em: 25/06/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricieri Naue Mocelin
Orientador

Prof. Me. Alex Roman
Avaliador

Prof. Dra. Gessi Koakoski
Avaliador

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, expresso minha profunda gratidão aos meus pais, Evaldo Alves Peroni e Veridiane Zilli Peroni, pelo apoio constante e incentivo incondicional desde o início da minha trajetória escolar. Se hoje tenho a honra de apresentar meu Trabalho de Conclusão de Curso no curso de Medicina em uma Universidade Federal de reconhecida excelência, devo grande parte dessa conquista a vocês.

Em segundo lugar, agradeço ao Prof. Dr. Ricieri Naue Mocelin pela oportunidade de participar de uma pesquisa de alta qualidade e relevância científica e acadêmica. Sou especialmente grato pela confiança depositada em mim desde o início das atividades, bem como pela paciência, disponibilidade e dedicação em me ensinar a trabalhar em um campo até então novo para mim. Além disso, agradeço pela amizade construída ao longo da graduação, por ser alguém com quem posso contar para boas conversas e momentos de desabafo. Sinto-me privilegiado por ter feito e continuar fazendo parte das atividades do LaNT.

Estendo meus agradecimentos aos colegas de laboratório, Matheus Ricardo Hoffmann de Souza e Cristine Somavilla Fagundes, pelo suporte inestimável na realização dos experimentos deste trabalho. A dedicação de vocês, muitas vezes abrindo mão de fins de semana, feriados e intervalos de almoço para colaborar no laboratório, foi fundamental para a execução deste projeto.

Por fim, agradeço aos grandes mestres que, dia após dia, ambulatório após ambulatório, aula após aula, nos inspiram a sermos melhores (futuros) médicos e seres humanos. Nenhuma dessas conquistas seria possível sem o exemplo e a dedicação de vocês.

I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not just a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him as though they were fairy tales.

Marie Curie in Pierre Curie (1923)

APRESENTAÇÃO

Este volume apresenta um Trabalho de Curso de Graduação, desenvolvido pelo acadêmico Bruno Zilli Peroni, que se configura como requisito parcial para a obtenção do título de Médico pela Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *campus* Passo Fundo, RS, sendo realizado sob orientação do Prof. Dr Ricieri Naue Mocelin. Este estudo objetivou investigar o mecanismo de ação da N-Acetilcisteína em um modelo de Estresse Crônico Imprevisível, aplicado em peixes-zebra. O trabalho foi desenvolvido durante três semestres acadêmicos, sendo dividido em três partes principais. No semestre 2024/1, realizado na quinta fase do curso de medicina, foi escrito o projeto de pesquisa durante o Componente Curricular Regular (CCR) de Trabalho de Curso I. Subsequente, durante a sexta fase, foram realizados os experimentos descritos no Projeto de Pesquisa, após apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais, sendo desenvolvida durante o CCR Trabalho de Curso II. Por fim, a terceira parte corresponde à redação de um artigo científico, à apresentação final e a conclusão do CCR de Trabalho de Curso III, que foram realizados durante o semestre de 2025/1. O trabalho foi desenvolvido em conformidade com o Manual de Trabalhos Acadêmicos da UFFS e com o Regulamento de Trabalho de Curso.

RESUMO

Introdução: Os transtornos mentais, como ansiedade e depressão, além de efeitos deletérios ao organismo, são responsáveis por elevados custos aos países, podendo atingir o montante de aproximadamente 6,5 trilhões de dólares até 2030. Tais condições são relacionadas à incapacidade e à morte prematura. Apesar de ser uma das principais doenças contemporâneas, os tratamentos farmacológicos disponíveis para os transtornos mentais possuem eficácia limitada, além de efeitos adversos notáveis. A hiperatividade glutamatérgica e o estresse oxidativo possuem íntima relação com o desenvolvimento de transtornos mentais, induzindo neuroinflamação, disfunção mitocondrial, dano oxidativo e excitotoxicidade. Nesse cenário, a N-acetilcisteína (NAC) se coloca como forte candidata, haja vista que possui propriedades neuroprotetivas, reduzindo o dano oxidativo, a neuroinflamação, a disfunção mitocondrial e a excitotoxicidade. **Objetivo:** investigar os efeitos da N-acetilcisteína (NAC) sob parâmetros comportamentais em um modelo de estresse crônico imprevisível em peixes-zebra. **Metodologia:** após período de quarentena, os animais foram divididos em grupos: controle (CTRL); controle estressado (CTRL+); N-acetilcisteína (NAC); N-acetilcisteína estressado (NAC+); cetamina (KET); cetamina estressado (KET+); fluoxetina (FLU); e fluoxetina estressado (FLU+). Durante os primeiros 7 dias, os grupos estressados foram submetidos ao protocolo de Estresse Crônico Imprevisível (ECI). No dia 7, os peixes-zebra foram submetidos ao tratamento farmacológico: CTRL e CTRL+ (veículo); NAC e NAC+ (N-acetilcisteína 10,0 mg/L durante 20 minutos); KET e KET+ (cetamina 20 mg/L, durante 20 minutos); FLU e FLU+ (fluoxetina, 10 mg/L durante 20 minutos). No dia 8, os animais foram submetidos ao teste de tanque novo, filmados durante 6 minutos e posteriormente analisados utilizando o software ANY-maze®. A normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram analisadas usando os testes de *D'Agostino-Person* e *Levene*, respectivamente. A análise estatística foi realizada através do teste de ANOVA de duas-vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey. Em todas as comparações, o nível de significância adotado foi $p < 0,05$. **Resultados:** O ECI reduziu o número de cruzamentos e tempo de permanência na área superior, e aumentou o tempo de permanência na inferior. Todos os tratamentos (NAC, FLU e KET) atenuaram o efeito ansiogênico induzido pelo ECI. A FLU também teve efeito ansiolítico em peixes não submetidos ao ECI. **Conclusões:** Dado o efeito positivo da NAC neste estudo em modelo animal, seu bom perfil de segurança em humanos e o baixo custo do medicamento, bem como as atuais evidências existentes em ensaios clínicos randomizados, este medicamento emerge no tratamento de transtornos neuropsiquiátricos.

Palavras-chave: Farmacologia; Glutamato; N-Acetilcisteína; Peixe-Zebra; Psiquiatria.

RESUMO NA LÍNGUA INGLESA

Introduction: Mental disorders, such as anxiety and depression, in addition to their deleterious effects on the body, impose significant economic burdens on countries, with projected costs reaching approximately 6.5 trillion dollars by 2030. These conditions are associated with disability and premature mortality. Despite being among the most prevalent contemporary diseases, pharmacological treatments for mental disorders have limited efficacy and are frequently associated with notable adverse effects. Glutamatergic hyperactivity and oxidative stress are closely linked to the development of mental disorders, inducing neuroinflammation, mitochondrial dysfunction, oxidative damage, and excitotoxicity. In this context, N-acetylcysteine (NAC) emerges as a strong candidate, given its neuroprotective properties, including the ability to reduce oxidative damage, neuroinflammation, mitochondrial dysfunction, and excitotoxicity. **Objective:** To investigate the effects of N-acetylcysteine (NAC) on behavioral parameters in a chronic unpredictable stress (CUS) model using zebrafish. **Methods:** Following a quarantine period, animals were divided into the following groups: control (CTRL); stressed control (CTRL+); N-acetylcysteine (NAC); stressed NAC (NAC+); ketamine (KET); stressed ketamine (KET+); fluoxetine (FLU); and stressed fluoxetine (FLU+). During the first seven days, the stressed groups were subjected to the Chronic Unpredictable Stress (CUS) protocol. On day 7, zebrafish received pharmacological treatment: CTRL and CTRL+ received vehicle; NAC and NAC+ received N-acetylcysteine (10.0 mg/L for 20 minutes); KET and KET+ received ketamine (20 mg/L for 20 minutes); FLU and FLU+ received fluoxetine (10 mg/L for 20 minutes). On day 8, animals were subjected to the novel tank test, filmed for 6 minutes, and subsequently analyzed using ANY-maze® software. Data normality and variance homogeneity were assessed using the D'Agostino-Pearson and Levene's tests, respectively. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. A significance level of $p < 0.05$ was adopted for all comparisons. **Results:** The CUS protocol reduced the number of transitions and time spent in the upper zone, while increasing time spent in the bottom zone. All treatments (NAC, FLU, and KET) attenuated the anxiogenic effect induced by CUS. Additionally, FLU exhibited an anxiolytic effect even in non-stressed fish. **Conclusions:** Given the positive effect of NAC in this animal model, its well-established safety profile in humans, low cost, and current evidence from randomized clinical trials, this compound emerges as a promising treatment for neuropsychiatric disorders.

Keywords: Acetylcysteine; Glutamic acid; Pharmacology; Psychiatry; Zebrafish.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	DESENVOLVIMENTO	13
2.1.	PROJETO DE PESQUISA	13
2.1.1.	Tema	13
2.1.2.	Problemas	13
2.1.3.	Hipóteses	13
2.1.4.	Objetivos	13
2.1.4.1.	Objetivo geral.....	13
2.1.4.2.	Objetivos específicos	13
2.1.5.	Justificativa.....	14
2.1.6.	Referencial teórico	15
2.1.6.1	O uso de Peixes-zebra como Modelo Animal	15
2.1.6.2	N-acetilcisteína (NAC)	16
2.1.6.3	Ação Antioxidante da N-acetilcisteína	17
2.1.6.4	Regulação da Atividade Glutamatérgica pela N-acetilcisteína	18
2.1.6.5	Papel dos Receptores Metabotrópicos de Glutamato do Tipo 2 no Mecanismo de Ação da N-Acetil Cisteína.....	22
2.1.7	Metodologia	23
2.1.7.1	Tipo de estudo	23
2.1.7.2	Local e período de realização.....	23
2.1.7.3	População e amostragem.....	23
2.1.7.4	Variáveis, instrumentos e coleta de dados.....	24
2.1.7.5	Processamento, controle de qualidade e análise de dados	26
2.1.7.6	Aspectos Éticos	26
2.1.8	Recursos	27
2.1.9	Cronograma.....	27
2.1.10	Referências Bibliográficas	28
ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO ÉTICA PELO CEUA		36
ANEXO B – EMENDA DE PRORROGAÇÃO DE PRAZO PELO CEUA		37
3.	RELATÓRIO DE PESQUISA.....	38
3.1	APRESENTAÇÃO.....	38
3.2	APRECIÇÃO	38
3.3	PREPARATIVOS	38
3.4	REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS	39

3.5	PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS	41
3.6	RESULTADOS.....	42
4.	ARTIGO CIENTÍFICO.....	43
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57

1. INTRODUÇÃO

Os transtornos de ansiedade são os distúrbios mentais mais comuns no mundo, com prevalência que aumentou 32% somente no ano de 2020, ano de início da pandemia do novo Coronavírus (COVID-19). Desse modo, essas condições se consolidam como uma das maiores causas de incapacidade e problemas de relacionamento social, levando muitas vezes à depressão e ao suicídio. Nesse cenário, de acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde, no que tange à saúde, o enfrentamento às doenças mentais deve ser a maior prioridade na agenda política dos países no período pós-pandêmico (Alvi, Kumar e Tabak, 2022; OPAS, 2023). Ademais, transtornos mentais como ansiedade e depressão, além de efeitos deletérios ao organismo, são responsáveis por elevados custos aos países, podendo atingir o montante de aproximadamente 6,5 trilhões de dólares até 2030. Tais condições são relacionadas à incapacidade e à morte prematura (Insel et al., 2013; Patel et al., 2018; Walker, McGee e Druss, 2015).

Apesar dos avanços recentes na compreensão da fisiopatologia dos transtornos mentais, sua neurobiologia ainda é pouco esclarecida, de modo que novos estudos que procurem explicar os processos patológicos que ocorrem à nível de Sistema Nervoso Central (SNC) e o mecanismo de ação de medicamentos neuropsiquiátricos são necessários (Minarini et al., 2016). Nesse sentido, tem se observado que a hiperatividade glutamatérgica e o estresse oxidativo possuem íntima relação com o desenvolvimento de transtornos mentais, uma vez que é observado, à nível de SNC, neuroinflamação, disfunção mitocondrial, dano a estruturas vitais - como DNA, proteínas e lipídios – e, principalmente, excitotoxicidade (Berk et al., 2013; Bradlow et al., 2022; Dean, Giorlando e Berk, 2011; Raghu et al., 2021; Reis et al., 2020).

Estudos demonstram correlação entre o comportamento tipo ansioso e depressivo com depleção de receptores metabotrópicos glutamatérgicos (mGluR2), sugerindo que a ativação do receptor pode gerar a melhora dos sintomas (Khodagholi et al., 2022; Sha et al., 2023). A esketamina (Spravato®), enantiômero S da ketamina, foi aprovada pela ANVISA em 2020 para pacientes com depressão maior não responsivos. Por ser um antagonista de receptores de glutamato do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), é capaz de reverter os sintomas depressivos em até 24 horas após a primeira dose, o que não é observado nos tratamentos convencionais, os quais necessitam de aproximadamente 14 a 21 dias para a redução dos sintomas (Aust et al., 2019; Freeman et al., 2019; Jansen e Darracot-Cankovic, 2001; Pal et al., 2002). Apesar dos benefícios, estudos demonstram que o Spravato® pode induzir tolerância, dependência,

ansiedade, além de apresentar efeitos dissociativos e potencial de abuso (Katz et al., 2021; Lima, Visacri e Aguiar, 2021; Mathai et al., 2023).

Nesse cenário, a N-acetilcisteína (NAC) se coloca como forte candidata no tratamento dessas condições neuropsiquiátricas, haja vista que possui propriedades neuroprotetivas, reduzindo o dano oxidativo, a neuroinflamação, a disfunção mitocondrial e a excitotoxicidade (Bradlow *et al.*, 2022; Tardiolo, Bramanti e Mazzon, 2018; Turkmen *et al.*, 2019). A NAC é um medicamento comercializado como agente mucolítico, bem como é o principal antídoto em ambiente hospitalar nos casos de intoxicação por paracetamol (Deepmala *et al.*, 2015). A NAC é um medicamento altamente seguro e com ótimo perfil de tolerabilidade, mesmo em altas doses, no qual os efeitos adversos possuem baixa incidência (Minarini *et al.*, 2016; Shahripour, Harrigan e Alexandrov, 2014).

A NAC vem sendo estudada no tratamento de transtornos mentais e neurodegenerativo em estudos pré-clínicos e clínicos (Dean, Giorlando e Berk, 2011; Lee *et al.*, 2021; Neill *et al.*, 2022; Pedre *et al.*, 2021). Por ser precursora da principal molécula antioxidante do SNC, a glutathiona (GSH), a NAC reduz a quantidade de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), garantindo uma importante atividade antioxidante neuronal (Dean, Giorlando e Berk, 2011; Minarini *et al.*, 2016; Pedre *et al.*, 2021; Raghu *et al.*, 2021).

Nos transtornos mentais, é observado um aumento de glutamato na fenda sináptica, o qual ativa os receptores NMDA e ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), induzindo a excitotoxicidade e consequentemente dano e morte neuronal. A NAC atua na homeostase glutamatérgica, auxiliando na redução da excitotoxicidade por liberar glutamato no espaço extracelular, estimulando os receptores mGluR, reduzindo assim a liberação sináptica de glutamato e a consequente ativação dos receptores NMDA e AMPA (Linck *et al.*, 2012; Raghu *et al.*, 2021).

É bem-aceita a ideia de que o estresse é um importante fator desencadeante de transtornos mentais, uma vez que há aumento de dano oxidativo e excitotoxicidade. Nesse sentido, diferentes estudos demonstram a eficácia da NAC no tratamento de transtornos mentais relacionados ao estresse, entretanto, o mecanismo de ação ainda é pouco esclarecido (Faria *et al.*, 2019; Kalueff, Stewart e Gerlai, 2014; Linck *et al.*, 2012; Mocelin *et al.*, 2019; Reis *et al.*, 2020).

Considerando que a neurobiologia dos transtornos mentais, inclusive aqueles relacionados ao estresse, ainda é obscura, sabe-se do envolvimento do sistema glutamatérgico, estresse oxidativo, neuroinflamação e excitotoxicidade (Reis *et al.*, 2020). Nesse sentido, este

estudo objetiva investigar o mecanismo de ação da NAC em um modelo de estresse crônico imprevisível em peixes-zebra.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. PROJETO DE PESQUISA

2.1.1. Tema

Investigação do mecanismo de ação da N-acetilcisteína (NAC) em um modelo de estresse crônico imprevisível (ECI) em peixes-zebra.

2.1.2. Problemas

Quais os efeitos comportamentais que o protocolo de Estresse Crônico Imprevisível (ECI) gera em peixes-zebra?

Quais os efeitos comportamentais da N-acetilcisteína (NAC) em peixes-zebra submetidos ao protocolo de ECI?

Qual o papel dos receptores metabotrópicos de glutamato tipo 2 (mGluR₂) sob parâmetros comportamentais em peixes-zebra submetidos ao protocolo de ECI?

2.1.3. Hipóteses

O protocolo de ECI gera comportamento do tipo ansioso em Peixes-Zebra.

A NAC reverte o efeito tipo-ansiosogênico induzido pelo protocolo de ECI em peixes-zebra

O uso de antagonista puro do receptor mGluR₂ (LY341495) bloqueia o efeito de reversão da NAC sob parâmetros comportamentais do tipo ansiosogênico induzidos pelo ECI em peixes-zebra

2.1.4. Objetivos

2.1.4.1. Objetivo geral

Investigar o mecanismo de ação da N-acetilcisteína (NAC) sob parâmetros comportamentais em um modelo de estresse crônico imprevisível em peixes-zebra.

2.1.4.2. Objetivos específicos

Analisar as repercussões comportamentais do protocolo de Estresse Crônico Imprevisível (ECI) em peixes-zebra.

Investigar o papel da N-acetilcisteína (NAC) em atenuar as repercussões comportamentais observadas ao submeter peixes-zebra ao protocolo de ECI.

Investigar os efeitos do antagonismo da NAC induzida por antagonista de receptor mGluR2 (LY341495) sob parâmetros comportamentais em um modelo de ECI em peixes-zebra.

2.1.5. Justificativa

A ansiedade é um dos transtornos mentais mais comuns no mundo, com prevalência que aumentou 32% somente no ano de 2020, ano de início da pandemia do novo Coronavírus (COVID-19), de modo que essa condição se consolida como uma das maiores causas de incapacidade e problemas de relacionamento social, levando muitas vezes à depressão e ao suicídio (Alvi, Kumar e Tabak, 2022). Aliado a isso, é bem-aceita a ideia de que o estresse é um fator desencadeante dos transtornos mentais, provocando alterações epigenéticas que acarretam comprometimento importante do funcionamento do Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Bartlett, Singh e Hunter, 2017).

Apesar dos avanços recentes em compreender a fisiopatologia da ansiedade, os tratamentos farmacológicos atuais possuem eficácia limitada, além de efeitos adversos notáveis (Minarini *et al.*, 2016). A N-acetilcisteína (NAC) é um medicamento que apresenta boa tolerabilidade e é utilizado desde as décadas de 70 e 80 como agente mucolítico, além de ser antídoto em casos de intoxicação por paracetamol. Apesar disso, seu mecanismo de ação não está totalmente esclarecido (Pedre *et al.*, 2021). Ainda assim, estudos clínicos demonstram que a NAC apresenta respostas terapêuticas também em transtornos neuropsiquiátricos, atuando sobre diferentes vias à nível de Sistema Nervoso Central (SNC), gerando interesse na comunidade científica (Berk *et al.*, 2013).

Acredita-se que a NAC exerça seus efeitos no SNC ao auxiliar na produção de glutathione (GSH), principal antioxidante do SNC, de modo a combater a neuroinflamação, dano oxidativo, disfunção mitocondrial e danos a macromoléculas vitais, como DNA, proteínas e lipídios (Dean, Giorlando e Berk, 2011; Minarini *et al.*, 2016; Pedre *et al.*, 2021; Raghu *et al.*, 2021; Turkmen *et al.*, 2019). Além disso, a NAC atua no SNC por meio do sistema Xc- (*antiporte* glutamato-cistina), localizado nos astrócitos, onde a NAC fornece cistina – um subproduto da NAC -, liberando glutamato no espaço extracelular. A liberação do glutamato para o espaço extracelular é capaz de restaurar a homeostase desse importante neurotransmissor (NT), em casos em que há desequilíbrio de sua liberação, como observado, por exemplo, na fisiopatologia da ansiedade, autismo, vícios e adições (Berk *et al.*, 2013; Bradlow *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2021; Linck *et al.*, 2012; Raghu *et al.*, 2021; Reis *et al.*, 2020).

Recentemente, tem se observado o envolvimento de receptores glutamatérgicos em transtornos mentais, principalmente os receptores metabotrópicos de glutamato do tipo 2

(mGluR₂), resultando na redução do comportamento do tipo ansioso e depressivo, sendo este um alvo terapêutico interessante na busca por novos medicamentos antidepressivos e ansiolíticos (Khodagholi *et al.*, 2022; Sha *et al.*, 2023). Ademais, estudos pré-clínicos em modelos de autismo e adição à cocaína demonstraram que a NAC induz a ativação do sistema *Xc*⁻, mediante liberação de cistina no plasma, aumentando, assim, os níveis extracelulares de glutamato e ativando mGluR₂ (Chen *et al.*, 2014; Moran *et al.*, 2005).

Cabe ressaltar que a utilização de peixes-zebra como modelo animal vem emergindo brutalmente nas últimas décadas, especialmente no que tange à manipulação genética e às doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas. Além de possuírem menor custo de manutenção e manipulação mais simples quando comparado aos roedores, esses animais possuem grande semelhança neuroanatômica e fisiológica em relação aos mamíferos, sendo muito úteis em estudos de neuropsicobiologia translacional (Chia *et al.*, 2022; Kalueff, Stewart e Gerlai, 2014; e Mrinalini *et al.*, 2023).

Considerando o envolvimento dos receptores de glutamato em transtornos mentais e o potencial da NAC em modular tais receptores, o presente estudo pretende investigar o mecanismo de ação da NAC sobre um modelo de Estresse Crônico Imprevisível (ECI) em peixes-zebra, de modo a compreender a possível redução no comportamento tipo-ansioso induzido pelo estresse.

2.1.6. Referencial teórico

2.1.6.1 O uso de Peixes-zebra como Modelo Animal

O uso de peixes-zebra como organismo modelo para estudos pré-clínicos foi introduzido no início dos anos 1960, devido à maior facilidade de manutenção e manipulação dessa espécie em relação aos roedores. Inicialmente, os estudos foram voltados à mutagênese, sendo que seu uso especificamente para doenças do SNC foi introduzido a partir dos anos 2000. Um fator desencadeante para o aumento do uso de peixes-zebra como modelo animal foi o sequenciamento de seu genoma, conduzido entre 2001 e 2013, que identificou 84% de correspondência entre genes de doenças humanas e de doenças replicáveis em peixes-zebra (Mrinalini *et al.*, 2023).

Nesse sentido, o uso de peixes-zebra no estudo de condições cerebrais complexas é um campo emergente e fundamental no estudo das neurociências translacionais e em pesquisas farmacológicas, que se justifica pela grande semelhança na fisiologia e na genética com os seres humanos, além de morfologia do SNC que se assemelha à dos mamíferos e de uma manipulação

genética relativamente simples, com baixo custo para manutenção e pouco espaço necessário para a criação de milhares desses animais (Kalueff, Stewart e Gerlai, 2014).

O encéfalo do peixe-zebra possui semelhança fundamental, do ponto de vista anatômico e neuroquímico, ao encéfalo humano, com circuitos neuronais baseados em neuroquímica muito semelhante, utilizando neurotransmissores (NT) como dopamina, serotonina, acetilcolina, histamina, glutamato e GABA. Além disso, peixes-zebra possuem sinais patológicos em comum aos seres humanos, como agregação proteica, degeneração neuronal, ativação de células gliais, etc., o que possibilita o uso desses animais em estudos pré-clínicos de doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas (Chia et al., 2022).

Considerando a depressão, já foi confirmado que vários fatores genéticos, estresses ambientais e distúrbios neuroquímicos desempenham um papel semelhante nessa condição em humanos e peixes-zebra. Outra vantagem do uso de peixes-zebra é o fato deles serem suscetíveis à grande maioria de fármacos antipsicóticos, ansiolíticos, antidepressivos, estabilizadores de humor, álcool, etc., a um custo aproximadamente 5-6 vezes menor em experimentos do que quando feitos com roedores, colocando-os como ótimos candidatos para estudos farmacológicos (Kalueff, Stewart e Gerlai, 2014).

Ademais, o protocolo de estresse crônico imprevisível aplicado em roedores já se provou funcional em adaptação para peixes-zebra, com efeitos que aumentam ansiedade, reduzem a locomoção e alteram os perfis de proteoma cerebral e a neurogênese (Kalueff, Stewart e Gerlai, 2014; Mocelim et al., 2019).

Além da aplicabilidade em estudos translacionais nas neurociências, a utilidade dos peixes-zebra em estudos epigenéticos também vem crescendo, motivado pela alta homologia genética com os seres humanos (70%) e pela alta semelhança nos genes relacionados às etapas embrionárias (Kalueff, Stewart e Gerlai, 2014).

2.1.6.2 N-acetilcisteína (NAC)

A NAC é um aminoácido natural, precursor da L-cisteína (Cys), que possui em sua composição química a adição de um grupo N-acetil, objetivando aumentar a sua biodisponibilidade e não ser rapidamente oxidada no plasma, tal como ocorre com a Cys, que é, quase por completo, convertida em cistina (Martinez-Banaclocha, 2022; Raghu *et al.*, 2021; Whillier *et al.*, 2009).

Quando utilizada por via oral, a NAC apresenta baixa biodisponibilidade (4 a 10%), com pico plasmático que ocorre em 1 a 2 horas, meia-vida de aproximadamente 6 horas e excreção que ocorre 30% por via renal, e 70% por via não renal (Minarini *et al.*, 2016;

Shahripour, Harrigan e Alexandrov, 2014). A NAC é um medicamento altamente seguro e com ótimo perfil de tolerabilidade. Mesmo em altas doses, os efeitos adversos possuem baixa incidência, e normalmente envolvem o trato gastrointestinal, sistema neurológico, musculoesquelético, dermatológico e comportamental, sendo náusea o efeito adverso mais comum (Bradlow *et al.*, 2022; Minarini *et al.*, 2016; Neill *et al.*, 2022).

A NAC é um medicamento comercializado como agente mucolítico, bem como é o principal antídoto em ambiente hospitalar nos casos de intoxicação por paracetamol. Além disso, a NAC, ou acetilcisteína, é aplicada secundariamente em casos de nefropatia induzida por contraste, na prevenção da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), como agente preventivo da fibrilação atrial e como terapia adjuvante em casos de HIV (Deepmala *et al.*, 2015). Mais recentemente, a NAC vem sendo utilizada no tratamento de doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas (Berk *et al.*, 2013; Bhatti *et al.*, 2018; Bradlow *et al.*, 2022; Deepmala *et al.*, 2015; Minarini *et al.*, 2016; Raghu *et al.*, 2021; Tardiolo, Bramanti e Mazzon, 2018).

2.1.6.3 Ação Antioxidante da N-acetilcisteína

A etiologia dos transtornos mentais, como a ansiedade, envolve dano oxidativo, neuroinflamação, hiperatividade glutamatérgica e neuroplasticidade patológica (Bradlow *et al.*, 2022; Reis *et al.*, 2020; Sha *et al.*, 2023). A nível intracelular, a proteção antioxidante é realizada a partir das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx), enquanto a proteção não-enzimática é conferida por moléculas que apresentam tióis em sua estrutura, como a Glutathione (GSH) (Bridges, Natale e Patel, 2011; Dal Santo *et al.*, 2014; Raghu *et al.*, 2021). No entanto, é necessário pontuar que o cérebro é uma região altamente ativa do ponto de vista metabólico, logo, possui alta produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), presentes em excesso em diferentes transtornos mentais, principalmente naqueles relacionados ao estresse (Berk *et al.*, 2013; Deepmala *et al.*, 2015).

As propriedades antioxidantes da GSH consistem na presença de um grupo sulfidríla livre como fonte pronta de redução para EROs, além de fornecer equivalentes redutores para a enzima GPx. Durante sua ação, a GSH doa seu H⁺, formando rapidamente um dissulfeto de glutathione e combatendo o peróxido, com a formação de água, que é degradado pela enzima CAT (Rushworth e Megson, 2014).

Grande parte dos efeitos da NAC se devem à sua conversão em Cys, para então formar a GSH (Bhatti *et al.*, 2018; Naziroğlu, Çiğ e Özgül, 2013; Pedre *et al.*, 2021; Rushworth e Megson, 2014; Shahripour, Harrigan e Alexandrov, 2014). A síntese da GSH, a partir da Cys,

ocorre em duas etapas: inicialmente, a cisteína se une à glutamina, formando um composto que, então, irá se unir à glicina, formando a GSH. As enzimas que participam dessas reações são a γ -glutamilcisteína sintase (γ -GCS) e a glutathione sintase (GS), respectivamente. Nesse processo, a cisteína é o fator limitante para a formação da GSH. O feedback negativo dessa reação é dado pela própria GSH, que inibe a enzima γ -GCS (Arakawa e Ito, 2007).

Ademais, a NAC é capaz de produzir atividade antioxidante mesmo quando não há depleção dos níveis de GSH (Ezerina *et al.*, 2018; Gleixner *et al.*, 2017; Pedre *et al.*, 2021). Nesse sentido, outra via de ação da NAC que vem sendo debatida mais recentemente é a produção de H_2S a partir da cisteína, que serve como substrato para a produção de espécies de enxofre sulfano, sendo que estes possuem efeito citoprotetor - elevam o metabolismo energético da mitocôndria, protegem contra o estresse oxidativo irreversível, aumentam a capacidade de captar espécies oxidantes e modulam o funcionamento proteico - que explicam os efeitos da NAC não atribuíveis à maior produção de GSH (Ezerina *et al.*, 2018; Gleixner *et al.*, 2017; Pedre *et al.*, 2021).

Em experimentos desenvolvidos *in vitro*, foi demonstrado que a NAC é capaz de realizar suas atividades antioxidantes por meio da cisteína dentro da mitocôndria, sem alterar os níveis de GSH. Nesse cenário, a cisteína doa um sulfeto de hidrogênio, H_2S , sendo a reação catalisada pelas enzimas cistationina γ -liase e/ou cistationina β -sintase. Essas espécies de enxofre sulfano são capazes de gerar hidropersulfetos mitocondriais, que combatem de modo muito mais ativo as EROs da mitocôndria. Desse modo, pode-se resumir que a ação antioxidante da NAC também se baseia na conversão de tióis derivados dela em “tióis superativos”, os hidropersulfetos, que atuam diretamente como antioxidantes e/ou protegem tióis proteicos críticos. No entanto, cabe ressaltar que essa linha ainda é nova e estudo *in vivo* desse mecanismo são necessários (Ezerina *et al.*, 2018).

2.1.6.4 Regulação da Atividade Glutamatérgica pela N-acetilcisteína

A NAC é capaz de modular a atividade glutamatérgica no SNC, reduzindo a excitotoxicidade, que ocorre em casos de excesso de liberação de glutamato - neurotransmissor excitatório -, culminando em dano e morte neuronal. A excitotoxicidade está relacionada à fisiopatologia dos transtornos mentais, como ansiedade, depressão, adição a drogas, autismo, esquizofrenia, transtorno obsessivo-compulsivo, entre outras condições neuropsiquiátricas (Deepmala *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2021; Raghu *et al.*, 2021; Schmaal *et al.*, 2012).

O mecanismo por meio do qual a NAC age sobre a modulação glutamatérgica é bem entendido em linhas gerais. Inicialmente, a cistina que está livre no plasma ultrapassa a BHE e

entra no tecido nervoso, onde, por meio do Sistema Xc^- , adentra no espaço intracelular dos astrócitos, enquanto o glutamato é liberado para o espaço extracelular. Inicialmente esse processo é importante para a produção intracelular de GSH - principal antioxidante do SNC -, a partir da cistina, garantindo um mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo. Posteriormente, a liberação de glutamato para o espaço extracelular é importante por garantir sua homeostasia, uma vez que, em excesso, esse NT induz excitotoxicidade (Bernabucci *et al.*, 2012; Bridges, Natale e Patel, 2011; Chen *et al.*, 2014; Deepmala *et al.*, 2015; Moran *et al.*, 2005; Reissner *et al.*, 2015). Em homeostasia, o Sistema Xc^- quase não é expresso em neurônios maduros, sendo assim, a proteção oxidativa é desempenhada pelos astrócitos, que expressam o Sistema Xc^- em abundância (Bridges, Natale e Patel, 2011).

Presentes em neurônios e células da glia, os mGluRs são ativados pelo glutamato extracelular, os quais possuem sua excitabilidade e sinalização sináptica regulada via segundos mensageiros. Os mGluRs são dímeros membros da superfamília de receptores acoplados à Proteína G, a qual, quando ativada pela ligação do glutamato, possui diversas funções dentro da célula, como a modulação de enzimas, canais iônicos, regulação do metabolismo, transcrição gênica e fatores de transcrição, além de múltiplos aspectos da função glial e da comunicação entre as células gliais e neurônios, entretanto, em excesso causam danos neuronais (Niswender e Conn, 2010).

Os mGluRs são classificados em 3 tipos, de acordo com suas características: o grupo 1 engloba mGluRs 1 e 5; o grupo 2, mGluRs 2 e 3; e o grupo 3, mGluRs 4, 6, 7 e 8. De modo geral, os mGluRs do grupo 1 são localizados no neurônio pós-sináptico, e sua ativação leva à despolarização celular. A modulação da excitabilidade neuronal decorre, neste caso, da modulação de canais iônicos desse neurônio - sobretudo os canais NMDA -, alterando a frequência de disparo ou a resposta a estímulos excitatórios. Em contraste, os mGluRs dos grupos 2 e 3 são localizados no neurônio pré-sináptico e inibem a liberação de NTs (Niswender e Conn, 2010; Sha *et al.*, 2023).

Além dos receptores metabotrópicos, os neurônios possuem Receptores Ionotrópicos de Glutamato (iGluRs), que são divididos nos seguintes subgrupos: AMPA; NMDA; cainato; e receptores δ (Ragu *et al.*, 2021; Vyklicky *et al.*, 2014). Os principais iGluRs excitatórios são os receptores AMPA e NMDA. Os receptores NMDA, localizados em neurônios pós-sináptico, são importantes neuroplasticidade, porém, também estão envolvidos na excitotoxicidade neuronal. Esses receptores, permeáveis principalmente pelo cálcio (Ca^{++}), geram potenciais de ação tônicos e fásicos, sendo que os potenciais tônicos parecem ser os principais responsáveis pela excitotoxicidade. Quando ativos, os receptores NMDA permitem a entrada do Ca^{++} , que,

quando em excesso, indiretamente ocasionam dano e degeneração neuronal, uma vez que o Ca^{++} está associado a liberação de NTs das vesículas sinápticas, consequentemente, induzindo aumento de NTs na fenda sináptica (Deepmala *et al.*, 2015; Tardiolo, Bramanti e Mazzon, 2018; Vyklicky *et al.*, 2014).

Por outro lado, os receptores AMPA são os principais responsáveis pela neurotransmissão excitatória em mamíferos, sendo que a mudança na excitabilidade de receptores AMPA é um dos mecanismos primários da neuroplasticidade. Nesse sentido, as subunidades auxiliares dos receptores AMPA participam diretamente da neuroplasticidade de curto prazo, regulando a afinidade pelo glutamato e a condutância iônica. Cabe ressaltar que o principal íon que passa pelos receptores AMPA é o sódio (Kamalova e Nakagawa, 2021).

Um estudo realizado com ratos evidenciou que o pré-tratamento com agonistas de receptor NMDA ou AMPA atenuaram os efeitos da NAC em reduzir o comportamento do tipo depressivo, indicando que a via glutamatérgica é responsável pelos efeitos antidepressivos desse medicamento. Este efeito é somado a partir de outras vias metabólicas, que envolvem a modulação indireta da serotonina e da noradrenalina. Os mGluRs do tipo 1 são fundamentais para a modulação dos iGluRs *in vivo* (Linck *et al.*, 2012). De modo semelhante, estudo clínico que avaliou a adição por jogos - que está relacionada à hiperatividade glutamatérgica - comprovou que o bloqueio de receptores NMDA foi capaz de inibir a sensação de prazer associado aos jogos (Berk *et al.*, 2013).

Cabe mencionar, também, a importância do Transportador de Aminoácidos Excitatórios do Tipo 2 (EAAT2) - presente em astrócitos - em captar o glutamato extracelular do espaço sináptico, prevenindo a excitotoxicidade neuronal. O glutamato absorvido pelos astrócitos é convertido em glutamina, que é enviada para os neurônios, onde é transformada em glutamato e armazenada em vesículas sinápticas (Reissner *et al.*, 2015; Schmaal *et al.*, 2012). O abuso de cocaína induz depleção de EAAT2 em pacientes adictos, o qual foi restaurada pela NAC em estudo pré-clínico. Neste estudo, a NAC foi capaz de reduzir o comportamento de abstinência, sendo atenuado o efeito da NAC ao associar antagonistas EAAT2, mantendo o comportamento de abstinência, indicando a relevância desses transportadores no mecanismo de ação da NAC sobre a adição por drogas (Reissner *et al.*, 2015).

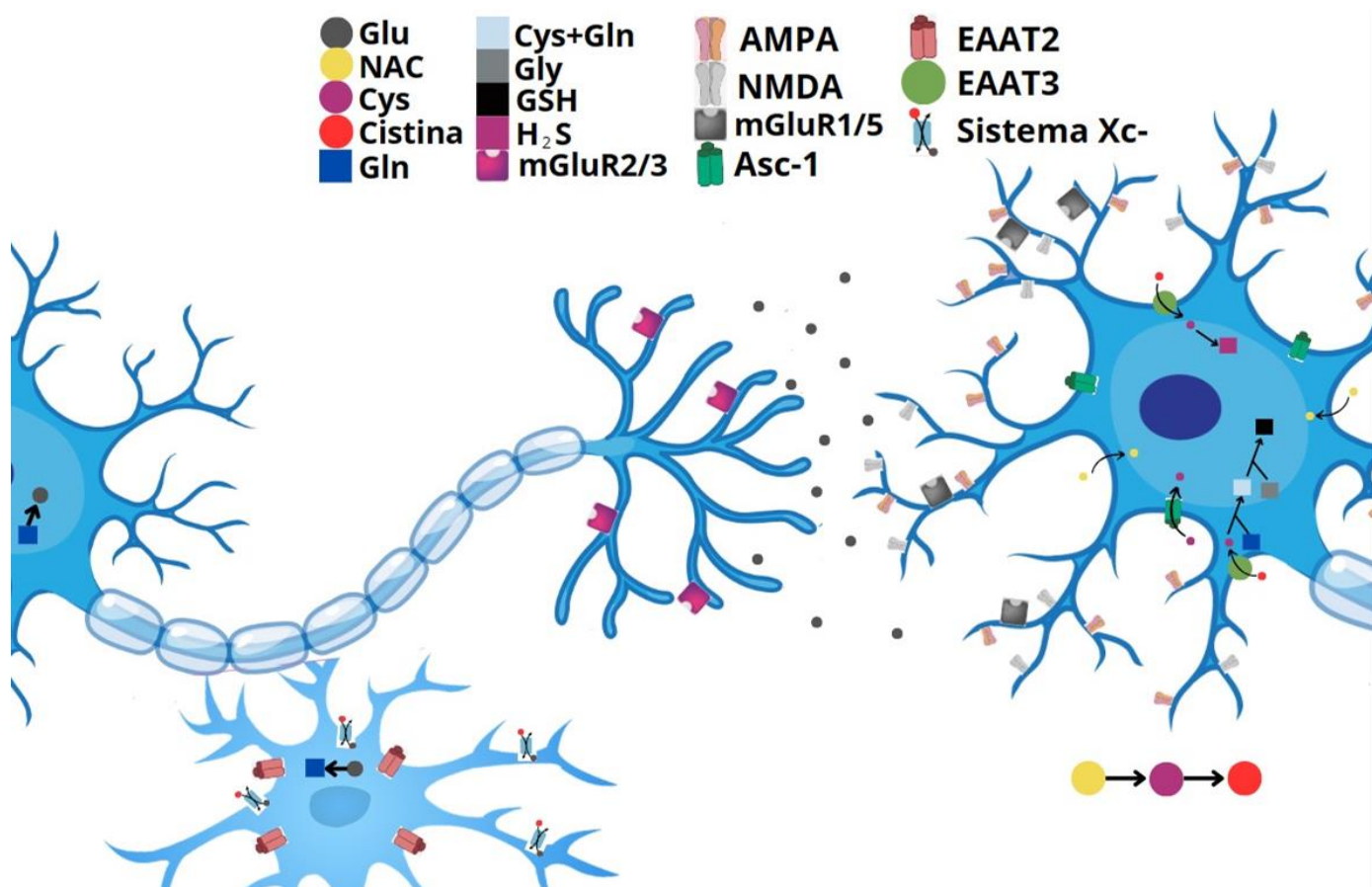


Figura 1: Ilustração do mecanismo de ação da NAC no SNC.

As duas células da parte superior da imagem são neurônios, enquanto a célula do canto inferior é um astrócito. As flechas indicam a direção das principais reações químicas envolvidas no mecanismo de ação da NAC. A legenda acima corresponde aos símbolos utilizados na figura. Glu = Glutamato; NAC = N-acetilcisteína; Cys = Cisteína; Gln = Glutamina; Cys + Gln = γ -glutamilcisteína; Gly = Glicina; GSH = Glutathiona; H_2S = Sulfato de Hidrogênio; mGluR2/3 = Receptores Metabotrópicos de Glutamato 2 e 3; AMPA = ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico; NMDA = N-metil-D-aspartato; mGluR1/5 = Receptores Metabotrópicos de Glutamato 1 e 5; Asc-1 = Transportador de Alanina-Serina-Cisteína do Tipo 1; EAAT2 = Transportador de Aminoácidos Excitatórios do Tipo 2; EAAT3 = Transportador de Aminoácidos Excitatórios do Tipo 3; Sistema Xc- = Antiporte Cistina-Glutamato.

Fonte: autoria própria, 2024.

Por fim, estudos demonstram que moduladores glutamatérgicos, como a ketamina, são compostos promissores no tratamento de doenças mentais (McEwen et al., 2015; Murrough, Abdallah e Mathew, 2017; Popoli et al., 2011; Swanson et al., 2005). Em 2006, um estudo clínico demonstrou que uma dose subanestésica de ketamina foi capaz de reverter os sintomas depressivos de forma sustentada por uma semana. Essa rápida resposta antidepressiva, em comparação com as semanas ou meses necessários para os fármacos atualmente disponíveis, fortalece a hipótese de que moduladores desse sistema podem ser agentes inovadores no tratamento de transtornos mentais (Andrade, 2017; Glue et al., 2017; Krystal, Sanacora e Duman, 2013; Taylor et al., 2018; Vidal et al., 2018; Zanos et al., 2016; Zarate et al., 2012; Zarate et al., 2006). Recentemente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou a esketamina (SPRAVATO®, Jonhson & Jonhson) para o tratamento de pacientes com

depressão maior não-responsivos a antidepressivos. A esketamina (Spravato®) é um enantiômero S da cetamina sob formulação farmacêutica de spray nasal, disponível a um alto custo (Ministério da Saúde, 2020). Apesar disso, tem-se observado que o tratamento tem gerado efeitos adversos importantes, como sintomas dissociativos, distúrbios de percepção e adição (Moussiopoulou et al., 2023). Nesse sentido, a NAC possui um grande potencial para o tratamento de transtornos mentais por apresentar similaridade com o mecanismo de ação da ketamina, atuar sobre diferentes alvos terapêuticos e oferecer menores efeitos adversos se comparados às terapias atuais.

2.1.6.5 Papel dos Receptores Metabotrópicos de Glutamato do Tipo 2 no Mecanismo de Ação da N-Acetil Cisteína

A principal função dos receptores metabotrópicos de glutamato do tipo 2 (mGluR₂) pré-sinápticos consiste em reduzir a taxa de disparos neuronais, resultando em menor liberação de glutamato na fenda sináptica (Bridges, Natale e Patel, 2011; Minarini *et al.*, 2016).

Estudos pré-clínicos demonstram a íntima relação entre a atividade da NAC e os mGluR₂ (Chen *et al.*, 2014; Moran *et al.*, 2005). Em modelo de autismo por exposição fetal ao ácido valpróico, é observado elevada atividade glutamatérgica no SNC. O tratamento com NAC foi capaz de inibir a elevada atividade glutamatérgica, diminuindo o comportamento ansioso e aumentando a interação social. Segundo o estudo, tal efeito da NAC foi mediante atividade do Sistema *Xc*- e de mGluR₂. Ademais, a expressão de mGluR₂ esteve reduzida no modelo de autismo, o que explica a atividade glutamatérgica elevada - menor regulação negativa da sinapse glutamatérgica por esses receptores (Chen *et al.*, 2014).

De modo análogo, a NAC reduziu o comportamento de adição à cocaína em ratos. O estudo demonstrou que a inibição de mGluR₂ anulou os efeitos da NAC em reduzir o comportamento de adição por cocaína, ou seja, a NAC possui mecanismo de ação nesse modelo através do mGluR₂, o qual foi comprovado ao administrar conjuntamente com NAC e previamente à cocaína um antagonista mGluR₂ (LY341495) (Moran *et al.*, 2005). Concluiu-se então que o aumento dos níveis extracelulares de glutamato, mediante Sistema *Xc*-, ativa os mGluR₂, reduzindo, assim, a excitotoxicidade (Dean, Giorlando e Berk, 2011; Deepmala *et al.*, 2015; Moran *et al.*, 2005; Reissner *et al.*, 2015; Schmaal *et al.*, 2012).

Ademais, um estudo recente avaliou o uso da ocitocina para combater sintomas depressivos e ansiosos em um modelo de Doença de Huntington induzido em ratos. Esse modelo foi capaz de aumentar o comportamento do tipo ansioso e depressivo nos ratos, reduzindo o número de receptores de ocitocina e mGluR₂, bem como a GSH. O pré-tratamento

com ocitocina foi capaz de melhorar os sintomas depressivos e ansiosos, protegendo o SNC de apresentar as alterações nos receptores e moléculas supracitados. Além disso, o estudo mostrou uma correlação negativa entre expressão de mGluR₂ e comportamento do tipo ansioso e depressivo. Nesse sentido, a ativação de mGluR₂ é, possivelmente, relacionada à melhora dos sintomas ansiosos e depressivos (Khodagholi *et al.*, 2022).

A ansiedade parece envolver a expressão anormal de moléculas relacionadas à neuroplasticidade, sendo que um dos fatores envolvidos nesse processo consiste nos mGluRs (Sha *et al.*, 2023). Dessa maneira, compreende-se que o mecanismo de ação da NAC em transtornos mentais pode envolver o aumento na ativação dos mGluR₂, receptores relevantes e possíveis alvos terapêuticos no tratamento da ansiedade e depressão. Portanto, são necessários estudos que avaliem se esse mecanismo relacionado aos mGluRs do grupo 2 também são relevantes em modelos que induzem comportamento do tipo ansioso e depressivo.

2.1.7 Metodologia

2.1.7.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo quantitativo, experimental, controlado, randomizado, cego, de cunho analítico a partir de análise comportamental e de status oxidativo em modelo animal.

2.1.7.2 Local e período de realização

Estudo a ser realizado durante o período de agosto de 2024 a julho de 2025, no Laboratório de Neuropsicobiologia Translacional (LaNT) da Universidade Federal da Fronteira Sul, *campus* Passo Fundo, localizado no município de Passo Fundo, no estado do Rio Grande do Sul.

2.1.7.3 População e amostragem

A determinação do tamanho do grupo experimental foi realizada mediante um cálculo amostral planejado, levando em consideração o desfecho primário de cada modelo e as informações disponíveis na literatura. Para realizar o cálculo amostral foi utilizado o software G*Power® (versão 3.5.0, versão gratuita) a partir das informações do número de grupos experimentais, do valor de significância α de 5%, do poder do teste estatístico de 80 %, da diferença esperada entre as médias de 50% e da estimativa do desvio padrão de 40%, resultando em um tamanho amostral de 240 animais, no entanto, considerando que o estudo será realizado em triplicata, o número total de animais será de 720. Os resultados também indicam que tamanho amostral de 24 animais ($n=24$) é adequado para as análises comportamentais. Mais detalhes metodológicos, no que tange ao cálculo amostral, são explorados em Mocelin *et al.*

(2015).

2.7.1.4 Variáveis, instrumentos e coleta de dados

Em todos os experimentos, serão avaliados o impacto do sexo (machos e fêmeas) e o efeito do tanque, garantindo que haja pelo menos dois tanques por grupo experimental. Isso é feito para evitar qualquer interferência visual ou contaminação. A atribuição dos tratamentos para os tanques de aclimação será realizada de maneira aleatória e com randomização. Para a análise de comportamento e estresse oxidativo, os pesquisadores envolvidos estarão cegos quanto aos grupos experimentais, e cada aquário será identificado por um código gerado por um pesquisador que não participará dos experimentos. Esses códigos serão revelados apenas durante a análise estatística.

Com o intuito de representar de forma mais eficaz a diversidade genética da população, optou-se por utilizar peixes-zebra adultos com cerca de quatro meses de idade, pertencentes à linhagem wild-type (caracterizada pelo fenótipo short-fin). Os animais serão adquiridos de fornecedor especializado (Delphis, Porto Alegre/RS). Antes de iniciar os experimentos, os animais passarão por um período de quarentena com duração de 30 dias. Durante esse período, serão mantidos em um sistema de circulação de água. As condições de quarentena serão rigorosamente monitoradas, garantindo parâmetros físico-químicos ideais, de acordo com padrões estabelecidos para aclimação e alimentação, conforme previamente descrito na literatura científica (Mocelin *et al.*, 2018; Mocelin *et al.*, 2019).

Após o período de quarentena, os animais serão introduzidos nos tanques de 16 litros de forma aleatória, utilizando números gerados aleatoriamente por computador. Cada tanque conterá 12 animais, sendo seis machos e seis fêmeas. A alocação dos animais em grupos experimentais será realizada de maneira aleatória em cada etapa do processo, usando a ferramenta disponível em www.random.org. Os pesquisadores encarregados da manipulação dos animais e das análises comportamentais permanecerão sem conhecimento dos grupos experimentais durante todo o processo. A revelação da codificação ocorrerá somente após a conclusão das análises.

A NAC será adquirida da Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, EUA) e o antagonista de mGluR₂ (LY341495), da Tocris Cookson Ltd. (Bristol, UK). Para realização dos experimentos, inicialmente os animais serão divididos em grupos: controle (CTRL); controle estressado (CTRL+); N-acetilcisteína (NAC); N-acetilcisteína estressado (NAC+); cetamina (KET); cetamina estressado (KET+); antagonista LY341495 (ANT); antagonista LY341495 estressado (ANT+); ANT+NAC (ANAC); ANT+NAC estressado (ANAC+). Durante os primeiros 7 dias,

os grupos estressados serão submetidos ao protocolo de Estresse Crônico Imprevisível (ECI) e não receberão nenhum tratamento farmacológico. No dia 8, os peixes serão submetidos ao tratamento farmacológico: CTRL e CTRL+ (veículo); NAC e NAC+ (N-acetilcisteína 10 mg/L durante 20 minutos); KET e KET+ (cetamina 20 mg/L durante 20 minutos); ANT e ANT+ (LY341495 1 mg/kg, i.p.); ANAC e ANAC+ (LY341495 1 mg/kg, i.p., após 30 minutos exposto à NAC 10,0 mg/L durante 20 minutos). A água será utilizada como veículo para diluição dos fármacos. As concentrações dos fármacos e tempo de exposição são baseadas em estudos anteriores (Michelotti *et al.*, 2018; Nuara, Gourdon e Huot, 2022; Riehl, 2011; Seo, 2022; Witkin *et al.*, 2016). Ao final da exposição farmacológica, os animais serão submetidos a algum dos agentes estressores do ECI. No dia 9, os animais serão submetidos ao teste comportamental, os quais serão transferidos cuidadosamente e individualmente ao aparato do teste de tanque novo, filmados durante 6 minutos e posteriormente analisados utilizando o software ANY-Maze™ (Stoelting Co., USA) que atua sobre os arquivos de filmagem e posterior processamento estatístico dos resultados obtidos no Teste de Tanque Novo (NTT), dispensando instrumentos extras no que tange à coleta de dados.

No NTT, em aquário de dimensões 24 x 8 x 20 cm, os seguintes parâmetros comportamentais serão avaliados: distância percorrida (m), número de cruzamentos, número de entradas e tempo de permanência (s) na área superior e inferior do aquário (Mocelin *et al.*, 2015; Mocelin *et al.*, 2018; Mocelin *et al.*, 2019).

O protocolo de ECI consiste na realização de 2 estímulos estressores diariamente, escolhidos aleatoriamente - a fim de evitar a habituação -, conforme as opções que seguem: perseguição com rede (8 min); redução do nível de água até atingir a exposição da dorsal dos peixes (2 min); aglomeração em um béquer de 250 mL (50 min); redução da temperatura da água para 23 °C (30 min); elevação da temperatura da água para 33 °C (30 min); 3 trocas consecutivas de tanque, em 30 minutos. Serão colocados cartões branco foscos (30 x 60 cm) entre os tanques, a fim de evitar contato visual entre peixes no mesmo plano (Gallas-Lopes *et al.*, 2023; Mocelin *et al.*, 2019; Piato *et al.*, 2011; Rambo *et al.*, 2017).

Cabe ressaltar que o autor principal deste trabalho atuará em todas as etapas do estudo, desde sua concepção e formação, até a análise estatística e redação do artigo. Após fase experimental, as carcaças dos animais serão descartadas em lixo contaminado e recolhido por empresa terceirizada da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Passo Fundo, o qual fará a destinação final.

A Figura 2 esquematiza o desenho experimental do estudo.

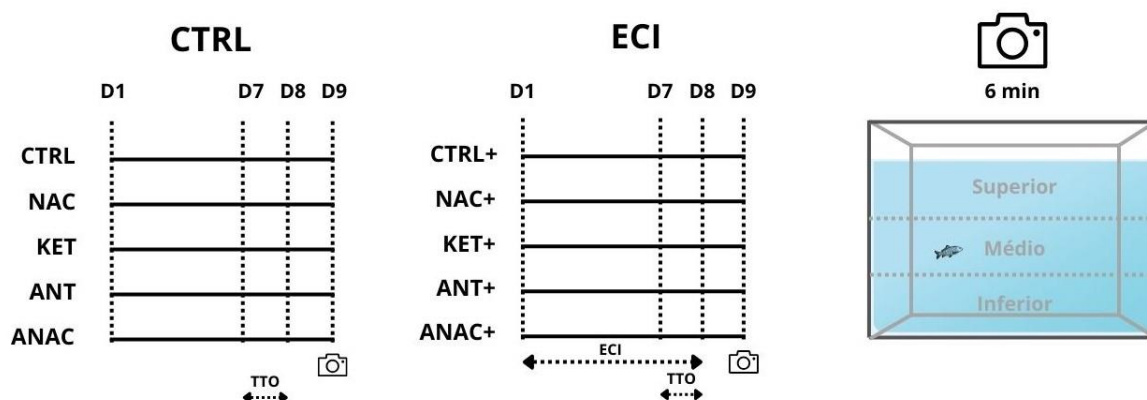


Figura 2: Desenho experimental do estudo

CTRL = controle; ECI = Estresse Crônico Imprevisível; D1 = Dia 1; D7 = Dia 7; D8 = Dia 8; D9 = Dia 9; NAC = N-Acetilcisteína; KET = cetamina; ANT = antagonista LY341495; ANAC = N-acetilcisteína + Antagonista LY143495; TTO = Tratamento.

Fonte: autoria própria, 2024.

2.1.7.5 Processamento, controle de qualidade e análise de dados

Para iniciar a avaliação dos dados, será realizada uma análise estatística descritiva e criados gráficos de frequência. Além disso, verificar-se-á a normalidade dos dados utilizando o teste de *Shapiro-Wilk*. Ao analisar o impacto das diferentes intervenções ou tratamentos farmacológicos aplicados nos modelos descritos neste projeto, a análise estatística apropriada ocorrerá levando em consideração a distribuição dos dados, utilizando como método estatístico o teste de ANOVA de um ou duas-vias, seguido do teste de *post hoc* de Tukey, utilizando o software *GraphPad Prism* (versão 8.4.3, TNT edition, MacOS version). O sexo dos animais será considerado como um possível fator, no entanto, se essa variável não demonstrar significância estatística, os dados serão combinados (machos e fêmeas). Os resultados serão apresentados na forma da média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). Em todas as comparações, o nível de significância adotado será $p < 0,05$.

2.1.7.6 Aspectos Éticos

Este estudo faz parte do Projeto Guarda-Chuva (PES-2021-0036) denominado “*Transtornos mentais relacionados ao estresse: uma abordagem pré-clínica da N-Acetilcisteína em Peixes-zebra*”, aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo nº 6.839.180.221 (Anexo A), cujo prazo foi prorrogado por meio de Emenda específica (Anexo B). Para garantir o bem-estar dos animais, eles serão mantidos em condições apropriadas. O desenho experimental seguirá os princípios dos 3 Rs (*replace, refine e reduce*), com o objetivo de otimizar a utilização de um menor número de animais, minimizando o estresse e o sofrimento durante todas as fases experimentais e na manutenção dos animais no laboratório. A eutanásia dos peixes será realizada por meio de um processo de resfriamento rápido (2-4 °C), conforme

as Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA (2018). O descarte do material biológico (incluindo carcaças de animais) serão acondicionados em sacos plásticos brancos e colocados sob refrigeração, utilizando-se freezer destinado exclusivamente para este fim até encaminhamento para descarte final com posterior recolhimento pela empresa responsável. Materiais perfurocortantes serão colocados em caixas para descarte especial.

Todos os procedimentos deste projeto serão conduzidos de acordo com as orientações do guia *ARRIVE GUIDELINES* (Pierce du Sert *et al.*, 2020), visando melhorar o desenho experimental, a análise dos dados e a preparação dos artigos científicos que serão elaborados com base nos resultados obtidos.

2.1.8 Recursos

Os recursos financeiros necessários para o desenvolvimento do projeto estão listados no Quadro 1, sendo eles, por completo, custeados pela equipe de pesquisa.

Quadro 1: Orçamento

Item	Quantidade	Valor Unitário	Valor Total
Peixes-zebra	720	R\$ 2,50	R\$ 1.800,00
Ração para peixes (400g)	1	R\$ 190,00	R\$ 190,00
Reagentes de manutenção de água	10	R\$ 60,00	R\$ 600,00
N-acetilcisteína (50 mg)	1	R\$ 1.269,00	R\$ 1.269,00
LY341495 (10 mg)	1	R\$ 2.575,00	R\$ 2.575,00
Cetamina (10 mL)	1	R\$ 120,00	R\$ 120,00
Kit Seringa e Agulha (insulina)	10	R\$ 30,00	R\$ 300,00
Licença ANY-Maze	1	R\$ 4.700,00	R\$ 4.700,00
Total			R\$ 11.554,00

Fonte: autoria própria, 2024.

2.1.9 Cronograma

O cronograma para realização das atividades relacionadas ao projeto, entre os meses de agosto de 2024 e julho de 2025, consta no Quadro 2.

Quadro 2: Cronograma

Atividades/Período	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Ago/ 2024	Set/ 2024	Out/ 2024	Nov/ 2024	Dez/ 2024	Jan/ 2025	Fev/ 2025	Mar/ 2025	Abr/ 2025	Mai/ 2025	Jun/ 2025	Jul/ 2025
Revisão de Literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Realização dos Experimentos			X	X	X							
Processamento e Análise dos Dados								X	X			
Redação do Artigo									X	X		

Divulgação dos Resultados											X	
Envio do Relatório ao CEUA												X

Fonte: autoria própria, 2024.

2.1.10 Referências Bibliográficas

ALVI, T.; KUMAR, D.; TABAK, B. A. Social anxiety and behavioral assessments of social cognition: A systematic review. **Journal of Affective Disorders.**, v. 15, n. 311, p. 17-30, ago. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35490878/>>. Acesso em: 17 jan. 2024.

ANDRADE, Chittaranjan. Ketamine for depression, 1: Clinical Summary of Issues Related to Efficacy, Adverse Effects, and Mechanism of Action. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 78, n. 4, p. 415-419, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28448702/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

ARAKAWA, M.; ITO, Y. N-acetylcysteine and neurodegenerative diseases: basic and clinical pharmacology. **The Cerebellum**, v. 6, n. 4, p. 309-314, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17853088/>>. Acesso em: 08 jan. 2024.

AUST, S. *et al.* Anxiety during ketamine infusions is associated with negative treatment responses in major depressive disorder. **European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 4, p. 529-538, fev. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30772118/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

BARTLETT, A. A.; SINGH, R; HUNTER, R. G. Anxiety and Epigenetics. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 978, p. 145-166, maio 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28523545/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

BERK, Michael *et al.* The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 3, p. 167-177, mar. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23369637/>>. Acesso em: 22 dez. 2023.

BERNABUCCI, Matteo *et al.* N-Acetyl-cysteine causes analgesia by reinforcing the endogenous activation of type-2 metabotropic glutamate receptors. **Molecular Pain**, v. 8, n. 77, p. 1-11, out. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23088864/>>. Acesso em: 11 jan. 2024.

BERTELLI, Pablo Ricardo *et al.* Anti-stress effects of the glucagon-like peptide-1 receptor agonist liraglutide in zebrafish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 111, n. 110.388, p. 1-9, jun. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34147534/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

BHATTI, Junaid *et al.* Systematic Review of Human and Animal Studies Examining the Efficacy and Safety of N-Acetylcysteine (NAC) and N-Acetylcysteine Amide (NACA) in Traumatic Brain Injury: Impact on Neurofunctional Outcome and Biomarkers of Oxidative Stress and Inflammation. **Frontiers in Neurology**, v. 8, n. 744, p. 1-14, jan. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29387038/>>. Acesso em: 13 jan. 2024.

BRADLOW, Richard C. J. *et al.* The Potencial of N-Acetyl-L-Cysteine (NAC) in the Treatment of Psychiatric Disorders. **Central Nervous System Drugs**, v. 36, n. 5, p. 451-482, maio 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35316513/>>. Acesso em: 19 dez. 2023.

BRIDGES, R. J.; NATALE, N. R.; PATEL, S. A. System xc- cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 1, p. 20-34, jan. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21564084/>>. Acesso em: 19 jan. 2024.

CHEN, Yu-Wen *et al.* Activation of mGluR2/3 underlies the effects of N-acetylcysteine on amygdala-associated autism-like phenotypes in a valproate-induced rat model of autism. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 8, n. 219, p. 1-9, jun. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24987341/>>. Acesso em: 17 jan. 2024.

CHIA, Kelda *et al.* Zebrafish as a model organism for neurodegenerative disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 15, p. 1-27, out. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36311026/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

DAL SANTO, Glaucia *et al.* Acute restraint stress induces an imbalance in the oxidative stress of the zebrafish brain. **Neuroscience Letters**, v. 13, n. 558, p. 103-108, jan. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24262751/>>. Acesso em: 18 dez. 2023.

DEAN, O; GIORLANDO, F.; BERK, M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanism of action. **Journal of Psychiatry and Neuroscience**, v. 36, n. 2, p. 78-86., mar. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21118657/>>. Acesso em: 21 dez. 2023.

DEEPMALA, Karankar *et al.* Clinical trials of N-acetylcysteine in psychiatry and neurology: A systematic review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 55, p. 294-321, ago. 2015. Disponível em: <>. Acesso em: 21 dez. 2023.

EZERINA, Daria *et al.* N-Acetyl Cysteine Functions as Fast-Acting Antioxidant by Triggering Intracellular H_2S and Sulfane Sulfur Production. **Cell Chemical Biology**, v. 25, n. 4, p. 447-459, abr. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29429900/>>. Acesso em: 10 jan. 2024.

FARIA, Melissa *et al.* Therapeutical potential of N-acetylcysteine in acrylamide acute neurotoxicity in adult zebrafish. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, nov. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31712630/>>. Acesso em: 20 dez. 2023.

FREEMAN, M. P. *et al.* Sex differences in response to ketamine as a rapidly acting intervention for treatment resistant depression. **Journal of Psychiatric Research**, v. 110, p. 166-171, mar. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30641350/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

GALLAS-LOPES, Matheus *et al.* Systematic review and meta-analysis of 10 years of unpredictable chronic stress in zebrafish. **Laboratory Animals (New York)**, v. 52, n. 10, p. 229-246, out. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37709998/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

GLEIXNER, Amanda M. *et al.* N-Acetyl-l-Cysteine Protects Astrocytes against Proteotoxicity without Recourse to Glutathione. **Molecular Pharmacology**, v. 92, n. 5, p. 564-575, nov. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28830914/>>. Acesso em: 11 jan. 2024.

GLUE, Paul *et al.* Ketamine's dose-related effects on anxiety symptoms in patients with treatment refractory anxiety disorders. **Journal of Psychopharmacology**, v. 31, n. 10, p. 1302-1305, out. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28441895/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

INSEL, T. R. *et al.* Innovative solutions to novel drug development in mental health. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 10, p. 2438–2444, dez. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23563062/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

JANSEN, K. L.; DARRACOT-CANKOVIC, R. The nonmedical use of ketamine, part two: A review of problem use and dependence. **Journal of Psychoactive Drugs**, v. 33, n. 2, p. 151–158, jun. 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11476262/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 2, p. 63–75, fev. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24412421/>>. Acesso em: 18 dez. 2023.

KAMALOVA, A.; NAKAGAWA, T. AMPA receptor structure and auxiliary subunits. **The Journal of Physiology**, v. 599, n. 2, p. 453-469, jan. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32004381/>>. Acesso em: 11 jan. 2024.

KATZ, Eva G. *et al.* Benefit-Risk Assessment of Esketamine Nasal Spray vs. Placebo in Treatment-Resistant Depression. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 109, n. 2, fev. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32860422/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

KHODAGHOLI, Fariba *et al.* Oxytocin Prevents the Development of 3-NP-Induced Anxiety and Depression in Male and Female Rats: Possible Interaction of OXTR and mGluR2. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 42, n. 4, p. 1105-1123, maio 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33201416/>>. Acesso em: 12 jan. 2024.

KRYSTAL, J. H.; SANACORA, G.; DUMAN, R. S. Rapid-acting glutamatergic antidepressants: the path to ketamine and beyond. **Biological Psychiatry**, v. 73, n. 12, p. 1133-1141, jun. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3671489/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

LEE, Tsung-Min *et al.* Effectiveness of N-acetylcysteine in autism spectrum disorders: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 55, n. 2, p. 196-206, fev. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32900213/>>. Acesso em: 19 dez. 2023.

LIMA, T. M.; VISACRI, M. B.; AGUIAR, P. M. Use of ketamine and esketamine for depression: an overview of systematic reviews with meta-analyses. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 78, n. 3, p. 311-338, mar. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34705064/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

LINCK, Viviane M. *et al.* AMPA glutamate receptors mediate the antidepressant-like effects of N-acetylcysteine in the mouse tail suspension test. **Behavioural Pharmacology**, v. 23, n. 2, p. 171-177, abr. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22327021/>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

MARTINEZ-BANACLOCHA, Marcos. N-Acetyl-Cysteine: Modulating the Cysteine Redox Proteome in Neurodegenerative Diseases. **Antioxidants**, v. 11, n. 2, p. 1-50, fev. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35204298/>>. Acesso em: 21 dez. 2023.

MATHAI, David S. *et al.* Reconsidering “dissociation” as a predictor of antidepressant efficacy for esketamine. **Psychopharmacology (Berlin)**, v. 240, n. 4, p. 827-836, abr. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36729145/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

MCEWEN, Bruce S. *et al.* Mechanisms of stress in the brain. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 10, p. 1353-1363, out. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26404710/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

MICHELOTTI, Paula *et al.* Ketamine modulates aggressive behavior in adult zebrafish. **Neuroscience Letters**, v. 684, p. 164-168, set. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30102959/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

MINARINI, Alessandro *et al.* N-acetylcysteine in the treatment of psychiatric disorders: current status and future prospects. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 13, n. 3, p. 279-292, nov. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27766914/>>. Acesso em: 21 dez. 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Spravato® (cloridrato de escetamina): novo registro**. Ministério da Saúde: Brasília, 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/novos-medicamentos-e-indicacoes/spravato-r-cloridrato-de-escetamina-novo-registro>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

MOCELIN, Ricieri *et al.* Behavioral and Biochemical Effects of N-acetylsysteine in Zebrafish Acutely Exposed to Ethanol. **Molecular Neurobiology**, v. 43, p. 458-464, dez. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29196951/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

MOCELIN, Ricieri *et al.* N-Acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 139, p. 1-22, dez. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26261019/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

MOCELIN, Ricieri *et al.* N-Acetylcysteine Reverses Anxiety and Oxidative Damage Induced by Unpredictable Chronic Stress in Zebrafish. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 2, p. 1188-1195, fev. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29876880/>>. Acesso em: 18 dez. 2023.

MORAN, Megan M. *et al.* Cystine/glutamate exchange regulates metabotropic glutamate receptor presynaptic inhibition of excitatory transmission and vulnerability to cocaine seeking. **Journal of Neurosciences**, v. 25, n. 27, p. 6389-6393, jul. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16000629/>>. Acesso em: 15 jan. 2024.

MOUSSIOPOULOU, Joanna *et al.* Dissociative side effects of repeated intranasal esketamine in a patient with preexisting dissociative symptoms. **Psychiatry Research Case Reports**, v. 2, n. 1, p. 1-3, jun. 2023. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2773021223000081>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

MRINALINI, R. *et al.* Zebrafish – The Neurobehavioural Model in Trend. **Neuroscience**, v. 520, n. 1, p. 95-518, jun. 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36549602/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

MURROUGH, J. W.; ABDALLAH, C. G.; MATHEW, S. J. Targeting glutamate signalling in depression: progress and prospects. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 7, p. 472-486, jul. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28303025/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

NAZIROĞLU, M.; ÇİĞ, B.; ÖZGÜL, C. Neuroprotection induced by N-acetylcysteine Against cytosolic glutathione depletion-induced Ca²⁺ influx in dorsal root ganglion neurons of mice: role of TRPV1 channels. **Neuroscience**, v. 242, p. 151-160, jul. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23545271/>>. Acesso em: 10 jan. 2024.

NEILL, Erica *et al.* N-Acetylcysteine (NAC) in Schizophrenia Resistant to Clozapine: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial Targeting Negative Symptoms. **Schizophrenia Bulletin Open**, v. 48, n. 6, p. 1263-1272, nov. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35857752/>>. Acesso em: 20 dez. 2023.

NISWENDER, C. M.; CONN, P. J. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 50, p. 295-322, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20055706/>>. Acesso em: 14 jan. 2024.

NUARA, S. G.; GOURDON, J. C.; HUOT, P. Evaluation of the effects of the mGluR_{2/3} antagonist LY341495 on dyskinesia and psychosis-like behaviours in the MPTP-lesioned marmoset. **Pharmacological Reports**, v. 74, n. 4, p. 614-625, ago. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35761013/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Saúde mental deve estar no topo da agenda política pós-COVID-19, diz relatório da OPAS**. OPAS: Washington, 2019. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/9-6-2023-saude-mental-deve-estar-no-topo-da-agenda-politica-pos-covid-19-diz-relatorio-da#:~:text=Em%202020%2C%20durante%20a%20pandemia,14%25%20no%20in%C3%ADcio%20de%202023.>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

PAL, H. R. *et al.* Ketamine dependence. **Anaesthesia and Intensive Care**, v. 30, n. 3, p. 382–384, jun. 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12075653/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

PATEL, V. *et al.* The Lancet Commission on global mental health and sustainable development. **Lancet**, v. 392, n. 10.157, p. 1553–1598, out. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30314863/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

PEDRE, Brandán *et al.* The mechanism of action of N-acetylcysteine (NAC): The emerging role of H_2S and sulfane sulfur species. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 228, p. 1-22, dez. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34171332/>>. Acesso em: 13 jan. 2024.

PIATO, Ângelo L. *et al.* Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, n. 2, p. 561-567, mar. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21187119/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

PIERCE DU SERT, Nathalie *et al.* Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. **Plos Biology**, v. 18, n. 7, p. 1-65, jul. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32663221/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

POPOLI, Maurizio *et al.* The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 13, n. 1, p. 22-37, nov. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3645314/>>. Acesso em 12 abr. 2024.

RADTKE, Kendra K. *et al.* Interaction of N-acetylcysteine and cysteine in human plasma. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 101, n. 12, p. 4653-4659, dez. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23018672/>>. Acesso em: 15 jan. 2024.

RAGHU, Ganesh *et al.* The Multifaceted Therapeutic Role of N-acetylcysteine (NAC) in Disorders Characterized by Oxidative Stress. **Current Neuropharmacology**, v. 19, n. 8, p. 1202-1224, ago. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33380301/>>. Acesso em: 18 dez. 2023.

RAMBO, Cassiano L. *et al.* Gender differences in aggression and cortisol levels in zebrafish subjected to unpredictable chronic stress. **Physiology & Behavior**, v. 171, p. 50-54, mar. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28039073/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

REIS, Carlos G. *et al.* Effects of N-acetylcysteine amide on anxiety and stress behavior in zebrafish. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 393, n. 4, p. 591-601, abr. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31768573/>>. Acesso em: 18 dez. 2023.

REISSNER, Kathryn J. *et al.* Glutamate transporter GLT-1 mediates N-acetylcysteine inhibition of cocaine reinstatement. **Addiction Biology**, v. 20, n. 2, p. 316-323, mar. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24612076/>>. Acesso em: 15 jan. 2024.

RIEHL, Russell *et al.* Behavioral and Physiological effects of acute ketamine exposure in zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 33, n. 6, p. 658-667, nov./dez. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21683787/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

RUSHWORTH, G. F.; MEGSON, I. L. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 142, n. 2, p. 150-159, fev. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24080471/>>. Acesso em: 21 dez. 2023.

SCHMAAL, Lianne *et al.* N-acetylcysteine normalizes glutamate levels in cocaine-dependent patients: a randomized crossover magnetic resonance spectroscopy study. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 9, p. 2143-2152, ago. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22549117/>>. Acesso em: 15 jan. 2024.

SEO, Mi Kyoung *et al.* Effects of Chronic LY341495 on Hippocampal mTORC1 signaling in mice with chronic unpredictable stress-induced depression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, p. 1-14 jun. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35742857/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

SHA, Zhongwei *et al.* Regulatory Molecules of Synaptic Plasticity in Anxiety Disorders. **International Journal of General Medicine**, v. 16, p. 2877-2886, jul. 2023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10332425/>>. Acesso em: 20 jan. 2024.

SHAHRIPOUR, R. B.; HARRIGAN, M. R.; ALEXANDROV, A. V. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. **Brain and Behavior**, v. 4, n. 2, p. 108-122, mar. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24683506/>>. Acesso em: 19 dez. 2023.

SWANSON, Chad J. *et al.* Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. **Nature Review Drug Discovery**, v. 4, n. 2, p. 131-144, fev. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15665858/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

TARDIOLO, G.; BRAMANTI, P.; MAZZON, E. Overview of the Effects of N-Acetylcysteine in Neurodegenerative Diseases. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 1-20, dez. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30551603/>>. Acesso em: 21 dez. 2023.

TAYLOR, Jerome H. *et al.* Ketamine for Social Anxiety Disorder: A Randomized, Placebo-Controlled Crossover Trial. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 2, p. 325-333, jan. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28849779/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

TURKMEN, Ruhi *et al.* Antioxidant and cytoprotective effects of N-acetylcysteine against subchronic oral glyphosate-based herbicide-induced oxidative stress in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 11, p. 11427-11437, abr. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30805841/>>. Acesso em: 16 jan. 2024.

VIDAL, Sonia *et al.* Efficacy and Safety of a Rapid Intravenous Injection of Ketamine 0.5 mg/kg in Treatment-Resistant Major Depression: An Open 4-Week Longitudinal Study. **Journal of Clinical Psychopharmacology**, v. 38, n. 6, p. 590-597, dez. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30346333/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

VYKLICKY, Vojtěch *et al.* Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. **Physiological Research**, v. 63, n. 1, p. 191-203, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24564659/>>. Acesso em: 18 jan. 2024.

WALKER, E. R.; MCGEE, R. E.; DRUSS, B. G. Mortality in mental disorders and global disease burden implications: a systematic review and meta-analysis. **JAMA psychiatry**, v. 72, n. 4, p. 334–341, abr. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25671328/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

WHILLIER, Stephney *et al.* Role of N-acetylcysteine and cystine in glutathione synthesis in human erythrocytes. **Redox Report**, v. 14, n. 3, p. 115-124, 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19490753/>>. Acesso em: 14 jan. 2024.

WITKIN, J. M. *et al.* The Rapidly Acting Antidepressant Ketamine and the mGluR_{2/3} Receptor Antagonist Ly341495 Rapidly Engage Dopaminergic Mood Circuits. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 358, n. 1, p. 71-82, jul. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27189960/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

ZANOS, Panos *et al.* NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. **Nature**, v. 533, n. 7.604, p. 481-486, maio 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27144355/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

ZARATE, Carlos A. *et al.* A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 63, n. 8, p. 856-864, ago. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16894061/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

ZARATE, Carlos A. *et al.* Relationship of ketamine's plasma metabolites with response, diagnosis, and side effects in major depression. **Biological Psychiatry**, v. 72, n. 4, p. 331-338, ago. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22516044/>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO ÉTICA PELO CEUA



**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS RÁPIDO, SUSTENTANDO E PROFILÁTICO DE N-ACETILCISTEÍNA (NAC) EM UM MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL EM PEIXES-ZEBRA (DANIO RERIO)", protocolada sob o CEUA nº 6839180221 (ID 000246), sob a responsabilidade de **Riciéri Naue Mocelin e equipe; Riciéri Naue Mocelin** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Fronteira Sul (CEUA/UFFS) na reunião de 11/06/2021.

We certify that the proposal "INVESTIGATION OF THE RAPID, SUSTAINED, AND PROPHYLACTIC EFFECT OF N-ACETYLCYSTEINE (NAC) IN ZEBRAFISH (DANIO RERIO) SUBMITTED TO UNPREDICTABLE CHRONIC STRESS.", utilizing 1536 Fishes (males and females), protocol number CEUA 6839180221 (ID 000246), under the responsibility of **Riciéri Naue Mocelin and team; Riciéri Naue Mocelin** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of South Border (CEUA/UFFS) in the meeting of 06/11/2021.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [05/2021](#) a [05/2023](#)

Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem: [Não aplicável biotério](#)

Espécie: [Peixes](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [3 a 6 meses](#)

N: [1536](#)

Linhagem: [Danio rerio / Wild-type](#)

Peso: [1 a 1 g](#)

Local do experimento: Laboratório do campus Passo Fundo

Realeza, 14 de junho de 2021

Prof. Dr. Valfredo Schlemper
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Fronteira Sul

Profa. Dra. Gabrielle Coelho Freitas
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Fronteira Sul

ANEXO B – EMENDA DE PRORROGAÇÃO DE PRAZO PELO CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais

Realeza, 16 de junho de 2023
CEUA N 6839180221

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Riciéri Naue Mocelin
Área: Ciências Biológicas

Título da proposta: "INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS RÁPIDO, SUSTENTANDO E PROFILÁTICO DE N-ACETILCISTEÍNA (NAC) EM UM MODELO DE ESTRESSE CRÔNICO IMPREVISÍVEL EM PEIXES-ZEBRA (DANIO RERIO)".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFES (ID 000326)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Fronteira Sul, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 26/abril/2023) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Prezado CEUA. Devido a atrasos na entrega de reagentes bioquímicos e moleculares, antagonistas dos receptores mGLU e NMDA/AMPA, dos quais alguns ainda não foram entregues por parte das empresas fornecedoras (problema da pandemia, falta de insumos e reagentes importados), solicito a prorrogação do prazo de execução do projeto CEUA Nº 6839180221.".

Comentário da CEUA: "Prezado pesquisador, A emenda de prorrogação de prazo deste Projeto de Pesquisa tramitou na 7ª Reunião Ordinária da CEUA, no dia 16 de junho de 2023. Após a leitura dos pareceres dos avaliadores, sendo aprovada pelos mesmos, foi submetido a votação na plenária e APROVADO pela maioria. Qualquer dúvida, colocamo-nos à disposição. Atenciosamente, Secretário da CEUA".

Profa. Dra. Fabíola Dalmolin
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Fronteira Sul

Prof. Dr. Daniel Galiano
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Fronteira Sul

3. RELATÓRIO DE PESQUISA

3.1 APRESENTAÇÃO

O presente estudo, intitulado “Investigação do Mecanismo de Ação da N-Acetil Cisteína em um Modelo de Estresse Crônico Imprevisível em peixes-zebra”, tem como objetivo estudar o mecanismo de ação deste medicamento sob parâmetros comportamentais em um modelo de estresse crônico imprevisível em peixes-zebra.

3.2 APRECIÇÃO

O projeto do TC foi redigido ao longo do Componente Curricular (CCr) de Trabalho de Curso I, no primeiro semestre de 2024, sob orientação do Prof. Dr. Ricieri Naue Mocelin. O protocolo de estudo da referida pesquisa foi organizado no mesmo período, estando de acordo com estudos prévios e as normas do Laboratório de Neuropsicobiologia Translacional (LaNT), sala 102, Bloco A, UFFS, *Campus* Passo Fundo.

Este estudo faz parte do Projeto Guarda-Chuva (PES 2021-0036) denominado “*Transtornos mentais relacionados ao estresse: uma abordagem pré-clínica da N-acetilcisteína em Peixes-zebra*”, que já estava aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFFS), sob o protocolo nº 6.839.180.221, conforme consta em Anexo A e Anexo B.

3.3 PREPARATIVOS

Após o término do CCr de Trabalho de Curso I, preparou-se o LaNT para o recebimento dos peixes-zebra. Idealizou-se a realização da pesquisa em duas etapas: na primeira, buscou-se comparar a NAC com o grupo controle negativo (água destilada) e com dois grupos controles positivos (fluoxetina e cetamina). Caso esta primeira etapa fornecesse resultado positivo para o uso da NAC com efeito ansiolítico sustentado no protocolo de ECI por 7 dias, prosseguiríamos para a segunda fase de experimentação, a fim de avaliar o efeito do antagonista de receptor LY341495 e, assim, inferir o papel dos receptores metabotrópicos de glutamato tipo 2 (mGluR₂). Nessa fase, utilizar-se-iam os grupos: controle, NAC, mGluR₂ e NAC + mGluR₂.

Justifica-se essa divisão em duas etapas a partir de questões logísticas que envolvem uma maior facilidade e acurácia dos dados ao se trabalhar com grupos menores, ao invés de manipular diversos grupos em um único dia, bem como pelo melhor aproveitamento do dinheiro público, tendo em vista que não se sabia se a NAC realmente apresentaria efeito do tipo ansiolítico no protocolo supracitado, sendo os compostos farmacológicos utilizados nesse

experimento de custo significativo.

3.4 REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Na primeira fase de experimentação, utilizou-se um grupo composto por 96 animais (50:50 machos e fêmeas, 4-6 meses de idade). Estes animais passaram por um período de quarentena com duração de 30 dias, sendo mantidos em um sistema de circulação de água com condições rigorosamente monitoradas, garantindo parâmetros físico-químicos ideais, de acordo com padrões estabelecidos para aclimação e alimentação. Após habituação, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais (controle, ketamina 20 mg/L, N-acetilcisteína 10 mg/L ou fluoxetina 10 mg/L) e expostos em grupos de 4 animais por vez, durante 20 minutos, em bquer de 1 litro. Imediatamente após a exposição, os animais foram cuidadosamente transferidos individualmente para o teste de tanque novo, filmados por 6 minutos e posteriormente analisados pelo software Any-MAZE®.

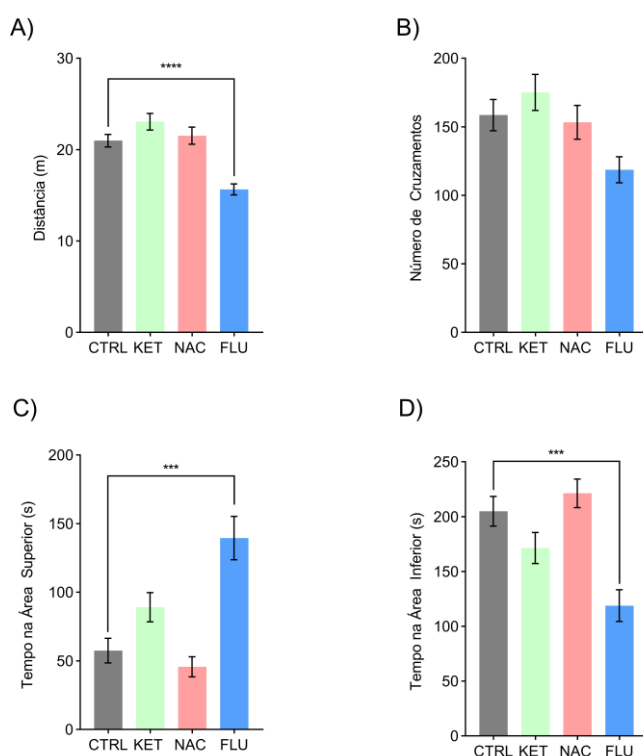


Figura 3: Efeitos da Ketamina (20 mg/L), N-acetilcisteína (10 mg/L) e da Fluoxetina (10 mg/L) no teste de tanque novo (NTT) em peixes-zebra. Dados expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste de ANOVA em uma via. $n=24$. CTRL = controle; NAC = N-acetilcisteína; KET = cetamina; FLU = fluoxetina.

Fonte: autoria própria (2025).

Após realização dos experimentos para avaliarmos a linha de base e validarmos os efeitos da exposição aos fármacos com a literatura, iniciamos a segunda etapa que foi investigar o possível efeito sustentado da NAC em um protocolo de Estresse Crônico Imprevisível (ECI).

Igualmente ao experimento anterior, os animais foram mantidos sob condições ideais de manutenção e passaram pelo período de quarentena (30 dias) antes de iniciarmos o experimento. Nesse protocolo, utilizou-se 80 peixes-zebra adulto (4-6 meses de idade) divididos igualmente entre machos e fêmeas (50:50). Após a habituação, os peixes-zebra foram divididos em 8 grupos, sendo 4 submetidos ao ECI e 4, não submetidos. O cronograma do protocolo de ECI utilizado está demonstrado na Tabela 1.

Protocolo Estresse Crônico Imprevisível (ECI)							
Dia da semana/turno	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Manhã	10:30: Perseguição por rede (8 min)	9:00: Estresse por aglomeração (50min)	08:30: Aquecer a água do aquário (33°C, 30 min)	9:30: Estresse por aglomeração (50min)	10:00: Abaixar o nível de água até exposição de dorso (2 min)	9:00: Esfriar a água do aquário (23°C, 30 min)	8:00: Troca de aquários (30 min)
Tarde	15:00: Abaixar o nível de água até exposição de dorso (2 min)	16:00: Esfriar a água do aquário (23°C, 30 min)	13:30: Troca de aquários (30 min)	16:00: Perseguição por rede (8 min)	15:00: Aquecer a água do aquário (33°C, 30 min)	14:00: Perseguição por rede (8 min)	15:00: Estresse por aglomeração (50min)

Tabela 1: cronograma do protocolo de estresse crônico imprevisível do dia 01 ao dia 07.
Fonte: autoria própria (2025).

Cada um dos braços da pesquisa recebeu, no sétimo dia do protocolo de ECI, água destilada (controle), fluoxetina (10 mg/L, 20 min), cetamina (20 mg/L, 20 min) ou NAC (10 mg/L, 20 min) (Figura 3). Após 24 horas do tratamento, os grupos foram transferidos para o tanque do Teste de Tanque Novo, filmados por 6 minutos e posteriormente analisados por meio do Software Any-MAZE™. Finalizada a segunda fase do estudo, analisou-se os dados por meio do Teste ANOVA de duas-vias, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey, que demonstrou efeito positivo para o uso da NAC nesse protocolo.

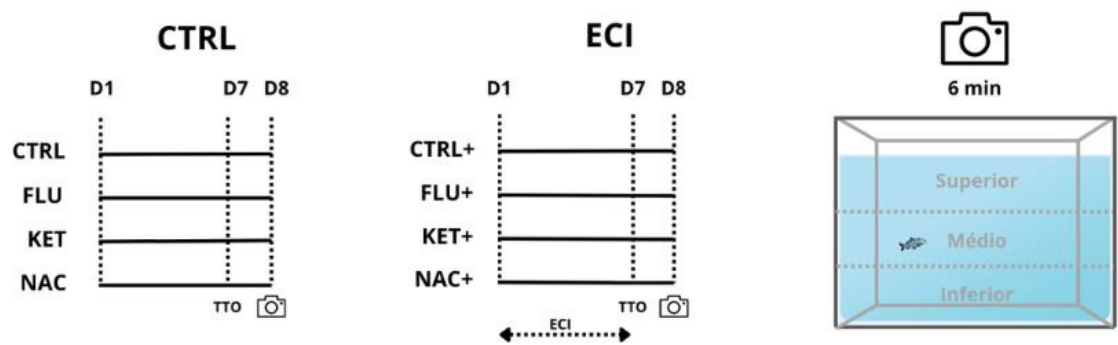


Figura 4: desenho experimental do estudo
CTRL = controle; ECI = estresse crônico imprevisível; D1 = Dia 1; D7 = Dia 7; D8 = Dia 8; D9 = Dia 9; NAC = N-acetil cisteína; FLU = fluoxetina; KET = cetamina; TTO = tratamento.
Fonte: autoria própria (2024).

Após realizada esta segunda etapa, prosseguiu-se para o planejamento e realização da

etapa 3, na qual o mesmo número de peixes-zebra seriam utilizados para avaliar o efeito do antagonista de receptor LY341495 e, assim, inferir o papel dos receptores metabotrópicos de glutamato tipo 2 (mGluR₂). Entretanto, questões externas afetaram a realização dessa terceira etapa: destacam-se um atraso para recebimento do fomento via Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), outros estudos e experimentos que estavam no cronograma do laboratório, bem como intercorrências no laboratório durante a fase de habituação dos animais, de modo que não foi possível a realização da terceira etapa do estudo, que será realizada posteriormente com intuito de assegurar a publicação científica deste trabalho.

3.5 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Para iniciar a avaliação dos dados, foi realizada uma análise estatística descritiva e criados gráficos de frequência. Além disso, verificou-se a normalidade dos dados utilizando o teste de *Shapiro-Wilk*. Ao analisar o impacto das diferentes intervenções ou tratamentos farmacológicos aplicados nos modelos descritos neste projeto, a análise estatística utilizou como método o teste de ANOVA de duas-vias, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey, por meio do software *GraphPad Prism* (versão 8.4.3, TNT edition, MacOS version). O sexo dos animais foi considerado como um possível fator de confusão, no entanto, essa variável não demonstrou significância estatística e os dados foram agrupados.

No teste de tanque novo, os seguintes parâmetros comportamentais foram avaliados: distância percorrida (m), número de cruzamentos, número de entradas e tempo de permanência (s) na área superior e inferior do aquário. Os dados obtidos estão representados na Figura 4.

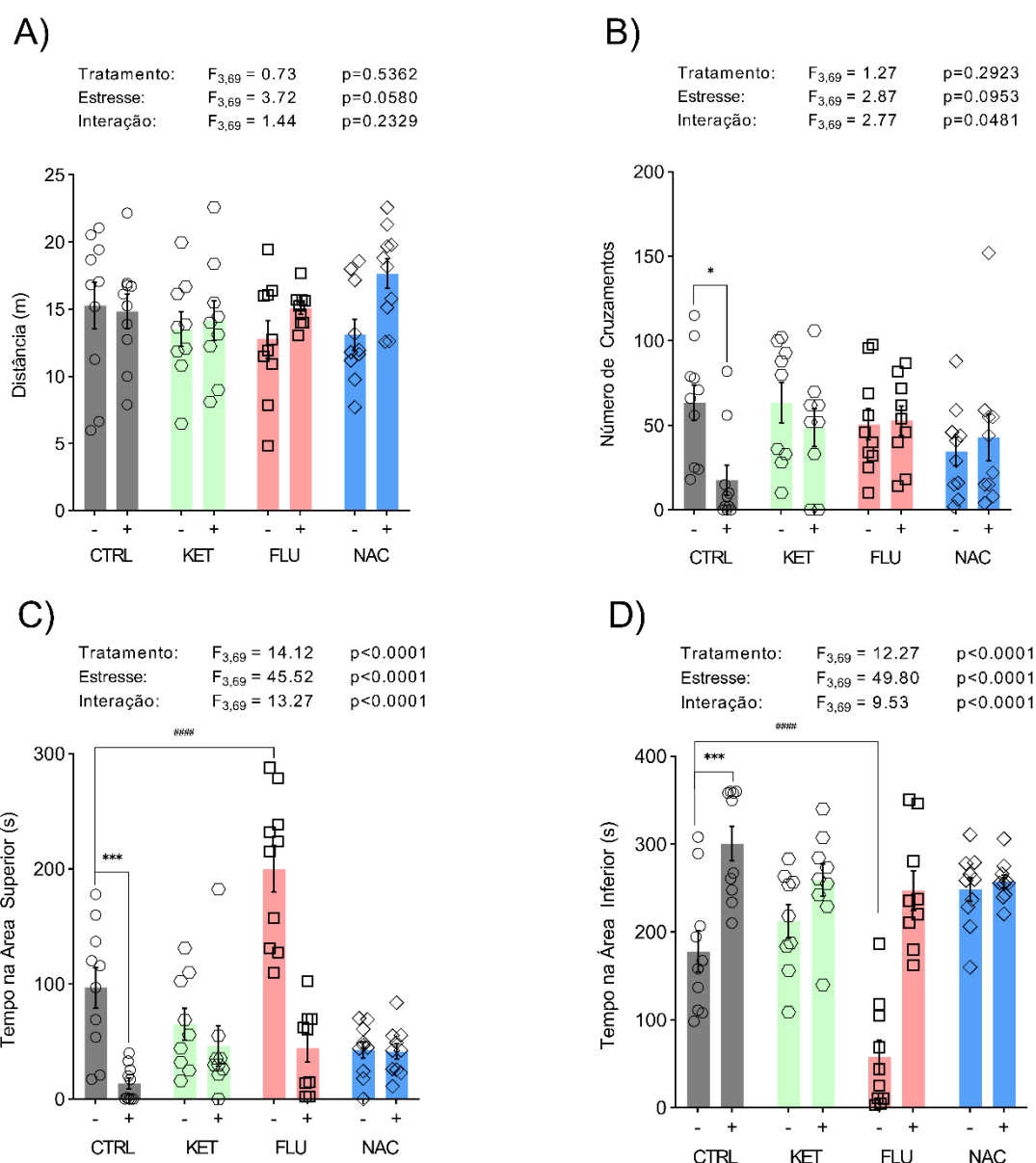


Figura 5: Efeitos da N-acetilcisteína no protocolo de estresse crônico imprevisível (ECI). Dados expressos em média $\pm$ S.E.M. Teste de ANOVA de duas vias. $n = 9-10$. CTRL = controle; NAC = N-acetilcisteína; KET = cetamina; FLU = fluoxetina; - = sem ECI; + = com ECI.

Fonte: autoria própria (2025).

3.6 RESULTADOS

As análises referentes aos experimentos supracitados foram executadas e estruturadas para divulgação através de artigo científico. O título do artigo é “Efeito tipo-ansiolítico sustentado da N-acetilcisteína em peixes-zebra submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível”, e após aprovação pela banca examinadora do TC, será traduzido e submetido à Revista *Neuropsychopharmacology*, sendo redigido de acordo com as instruções disponíveis em <https://www.nature.com/npp/authors-and-referees/preparation-of-manuscripts>.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Efeito tipo-ansiolítico sustentado da N-acetilcisteína em peixes-zebra submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível

Autores: Bruno Zilli Peroni¹; Ricieri Naue Mocelin^{2*}

¹ Laboratório de Neuropsicobiologia Translacional (LaNT), curso de medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Passo Fundo/RS

* Autor correspondente:

Nome: Ricieri Naue Mocelin

Endereço: Rua Capitão Araújo, 20, Centro, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: ricieri.mocelin@uffs.edu.br

RESUMO

Transtornos mentais são altamente prevalentes na sociedade, produzindo efeitos deletérios sobre indivíduos e sistemas de saúde. Apesar disso, faltam tratamentos com maior eficácia e adesão ao tratamento, bem como, menores índices de efeitos adversos, reforçando a necessidade de novas terapias. Diante disso, a N-acetilcisteína (NAC) surge como um promissor fármaco para o tratamento de transtornos mentais, principalmente devido a sua capacidade neuroprotetora. Nesse sentido, o estudo avaliou o efeito tipo-ansiolítico sustentado da NAC após uma única exposição, em peixes-zebra submetidos ao protocolo Estresse Crônico Imprevisível (ECI). Após habituação, os animais inicialmente foram divididos em grupo estressado (4 grupos) e não estressado (4 grupos). Após 7 dias de ECI, os animais foram subdivididos conforme exposição ao tratamento, em controle (água do sistema), NAC (10 mg/L), cetamina (20 mg/L) ou fluoxetina (10 mg/L), sendo cada um deles contendo um grupo não estressado e outro estressado. Os peixes foram expostos no dia 7 a um dos tratamentos durante 20 minutos e, imediatamente, retornaram ao tanque moradia. 24 horas após exposição aos fármacos, os animais foram submetidos ao teste de tanque novo e filmados durante 6 minutos. Utilizou-se o teste ANOVA de duas vias, seguido pelo teste post hoc de Tukey, para análise das intervenções. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Conforme esperado, o ECI reduziu o número de cruzamentos e tempo de permanência na área superior, e aumentou o tempo de permanência na inferior, conferindo comportamento tipo-ansiofênico. A NAC e a KET atenuaram o efeito tipo-ansiofênico induzido pelo ECI de forma sustentada após uma única exposição ao tratamento. Além disso, a FLU apresentou um comportamento tipo-ansiolítico em animais não estressados. Aqui, demonstramos pela primeira vez o efeito sustentado da NAC em atenuar os efeitos tipo-ansiofênico induzidos pelo ECI em peixes-zebra após uma única intervenção terapêutica durante 20 minutos. Dado o efeito positivo da NAC, seu bom perfil de segurança e baixo custo, ela emerge no tratamento ou como coadjuvante para transtornos neuropsiquiátricos relacionados ao estresse. Mais estudos são necessários para melhor evidenciar os efeitos da NAC, bem como estabelecer o mecanismo de ação.

Palavras-chave: Peixes-zebra; N-acetilcisteína; Transtornos Mentais.

ABSTRACT

Mental disorders are highly prevalent in society, producing deleterious effects on individuals and healthcare systems. Despite this, treatments with greater efficacy and adherence, as well as lower rates of adverse effects, are lacking, reinforcing the need for new therapies. In this context, N-acetylcysteine (NAC) emerges as a promising drug for the treatment of mental

disorders, mainly due to its neuroprotective capacity. In this sense, the study evaluated the sustained anxiolytic-like effect of NAC after a single exposure in zebrafish subjected to the Chronic Unpredictable Stress (CUS) protocol. After habituation, the animals were initially divided into a stressed group (4 groups) and a non-stressed group (4 groups). After 7 days of CUS, the animals were subdivided according to treatment exposure into control (system water), NAC (10 mg/L), ketamine (20 mg/L), or fluoxetine (10 mg/L), with each of these containing a non-stressed group and a stressed group. The fish were exposed on day 7 to one of the treatments for 20 minutes and immediately returned to their home tank. 24 hours after drug exposure, the animals were subjected to the novel tank test and filmed for 6 minutes. A two-way ANOVA test, followed by Tukey's post hoc test, was used for the analysis of the interventions. The significance level adopted was $p < 0.05$. As expected, CUS reduced the number of crossings and the time spent in the upper area, and increased the time spent in the lower area, conferring an anxiogenic-like behavior. NAC and KET attenuated the anxiogenic-like effect induced by CUS in a sustained manner after a single exposure to the treatment. Furthermore, FLU showed an anxiolytic-like behavior in non-stressed animals. Here, we demonstrate for the first time the sustained effect of NAC in attenuating the anxiogenic-like effects induced by CUS in zebrafish after a single therapeutic intervention for 20 minutes. Given the positive effect of NAC, its good safety profile, and low cost, it emerges in the treatment or as an adjuvant for stress-related neuropsychiatric disorders. More studies are needed to better evidence the effects of NAC, as well as to establish the mechanism of action.

Keywords: Mental Disorders; N-acetylcysteine; Zebrafish.

INTRODUÇÃO

Os transtornos de ansiedade são os distúrbios mentais mais comuns no mundo, com prevalência que aumentou 32% somente no ano de 2020, ano de início da pandemia do novo Coronavírus (COVID-19)¹. Transtornos mentais incluindo ansiedade e depressão, além de efeitos deletérios ao organismo, são responsáveis por elevados custos aos países, principalmente por conta da incapacidade e morte prematura²⁻⁴. Nesse cenário, de acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), o enfrentamento às doenças mentais deve ser a maior prioridade na agenda política de saúde pública no período pós-pandêmico⁵.

Apesar dos avanços recentes na compreensão da fisiopatologia dos transtornos mentais, sua neurobiologia ainda é pouco esclarecida⁶. Apesar disso, vem sendo observado que a hiperatividade glutamatérgica e o estresse oxidativo possuem íntima relação com o desenvolvimento de transtornos mentais, verificando-se neuroinflamação, disfunção

mitocondrial, dano a estruturas vitais e, principalmente, excitotoxicidade à nível de Sistema Nervoso Central (SNC)⁷⁻¹¹.

A N-Acetilcisteína (NAC) se coloca como candidata no tratamento de transtornos mentais, haja vista que apresenta importantes propriedades neuroprotetoras e antioxidantes, demonstrando mecanismo de ação multialvo, atuando sobretudo no sistema glutamatérgico, sendo estudada em transtornos mentais - inclusive naqueles relacionados ao estresse - e neurodegenerativos^{8,9,12-14}. A NAC é um mucolítico e antídoto para intoxicação por paracetamol, um medicamento seguro, com boa tolerabilidade e presente há mais de cinco décadas sob diferentes formulações, entretanto, com novas possibilidades de uso farmacológico ao passo que se investiga novo alvos terapêuticos^{6,15,16}.

É bem-aceita a ideia de que o estresse é um importante fator desencadeante de transtornos mentais, uma vez que há aumento de dano oxidativo e excitotoxicidade. O estresse crônico imprevisível (ECI) é um protocolo pré-clínico amplamente utilizado na pesquisa por induzir comportamento tipo-ansiedade, dano oxidativo e molecular em peixes-zebra^{12,17}. Ademais, estudos demonstram a eficácia da NAC no tratamento de transtornos mentais relacionados ao estresse, corroborando com sua possível utilização como tratamento adjuvante^{12,18,19}.

Aliado ao possível papel da NAC no tratamento de condições neuropsiquiátricas, sabe-se que os tratamentos farmacológicos atuais possuem eficácia limitada, além de efeitos adversos notáveis e alto grau de interrupção do tratamento por parte dos pacientes, sendo importante o desenvolvimento e a adoção de medicamentos que ultrapassem essas barreiras técnicas⁶. Nesse sentido, este estudo objetiva investigar o efeito sustentado da NAC na redução de sintomas do tipo-ansioso em peixes-zebra submetidos ao protocolo de ECI.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo analítico a partir de análise comportamental em modelo animal. Inicialmente, 80 peixes-zebra (*Danio rerio*) do tipo selvagem adultos (4-6 meses de idade; 50:50 machos:fêmeas), adquiridos de loja especializada (Recanto dos Peixes, Passo Fundo/RS), foram habituados e aclimatados por 30 dias em tanques de 40 litros (45 x 45 x 30cm), alimentados duas vezes ao dia com ração comercial em flocos (Poytara, Dia-a-Dia), com ciclo claro/escuro de 14:10 horas e mantidos sob parâmetros físico-químicos ideais para a espécie, de acordo com o descrito na literatura^{12,20}. Após aclimação, os animais foram alocados em aquários de 16 litros (40 x 20 x 24 cm) de modo aleatório, em 8 grupos experimentais com 10 animais cada (5 machos e 5 fêmeas). Destes, 4 foram submetidos ao ECI (+) e 4, não (-). Durante os primeiros

7 dias, os animais foram expostos ao protocolo de ECI, sendo submetido a distintos agentes estressores em diferentes horários: perseguição por rede (8 min), aquecimento de água à 33°C (30 min), resfriamento de água à 23°C (30 min), aglomeração em bquer de 250mL (50 min), três trocas de tanque consecutivas em 30 minutos e exposição do dorso (2 min)^{12,21}. No 7º dia, além dos animais passarem por algum agente estressor (grupo estressado), os peixes foram expostos à N-acetilcisteína (NAC, 10 mg/L, Sigma-Aldrich®), Fluoxetina (FLU, 10mg/L, Daforin®, Novaquímica), Ketamina (KET, 20 mg/L, Vetnil®) ou veículo (CTRL, água do sistema) durante 20 minutos em aquários de 2,7 litros (24 x 8 x 20 cm), sendo posteriormente alocados em seus respectivos tanques. A concentração e o tempo de exposição às drogas foram baseados em estudos anteriores e replicados no laboratório²²⁻²⁶.

Após 24 horas da exposição ao tratamento (dia 8), os animais foram submetidos ao teste de tanque novo (NTT) para análise comportamental dos seguintes parâmetros: distância percorrida (m), número de cruzamentos e tempo de permanência (s) na área superior e inferior do aquário teste. Os animais foram transferidos cuidadosamente e individualmente ao aparato, filmados durante 6 minutos e posteriormente analisados utilizando o software ANY-Maze® (Figura 1).

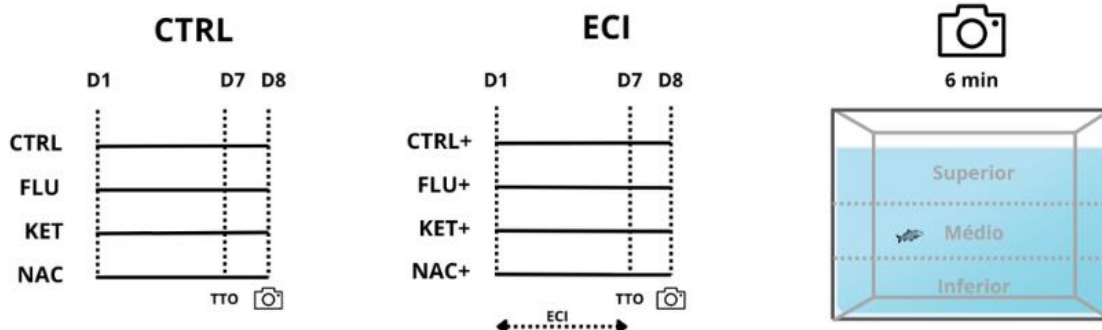


Figura 1. Desenho experimental. CTRL: grupo controle. ECI: estresse crônico imprevisível; FLU: fluoxetina; KET: cetamina; NAC: N-acetilcisteína; +: grupo estressado; D1: dia 01; D7: dia 07; D8: dia 08; TTO: tratamento. n = 9-10.

Para análise estatística, inicialmente realizou-se a análise de poder de efeito para detectar uma diferença no tempo gasto na zona superior do tanque. Este cálculo foi realizado usando o G*Power (versão 3.1) para Windows, considerando um alfa = 0,05, poder = 0,9, tamanho do efeito = 0,5 e desvio padrão = 0,4 (baseado em experimentos piloto e dados históricos do nosso grupo). A normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram analisadas usando os testes de *D'Agostino-Person* e *Levene*, respectivamente. Uma ANOVA de duas vias foi realizada para identificar os efeitos principais da exposição ao estresse (ECI) e dos tratamentos com NAC, FLU ou KET, assim como sua interação. Quando a ANOVA revelou

interações significativas, conduzimos comparações *post hoc* usando o teste de Tukey. Os dados são expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. Foi utilizado o software *GraphPad Prism* (versão 9.2.0) para análise estatística e elaboração gráfica. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob protocolo n° 6.839.180.221 e obedecendo os preceitos e orientações contidas em *ARRIVE GUIDELINES*²⁷.

RESULTADOS

A Figura 2 demonstra os efeitos dos tratamentos com NAC, FLU ou KET em peixes-zebra submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível (ECI). O ECI induziu uma redução no tempo de permanência na área superior e no número de cruzamento entre as áreas do aparato (Fig. 2C e Fig. 2B, respectivamente), bem como aumentou o tempo de permanência na área inferior (Fig. 2D). O teste de ANOVA revelou efeitos significativos do tratamento ($F_{3,69} = 14,12$, $p < 0,0001$), do estresse ($F_{3,69} = 45,52$, $p < 0,0001$) e da interação ($F_{3,69} = 13,27$, $p < 0,0001$) para o tempo gasto na área superior (Fig. 2C), assim como efeitos significativos do tratamento ($F_{3,69} = 12,27$, $p < 0,0001$), do estresse ($F_{3,69} = 49,80$, $p < 0,0001$) e da interação ($F_{3,69} = 9,53$, $p < 0,0001$) para o tempo gasto na área inferior (Fig. 2D), e da interação ($F_{3,69} = 2,77$, $p = 0,0481$) no número de cruzamento entre as áreas do aparato (Fig. 2B). A FLU induziu aumento no tempo de permanência na área superior (Fig. 2C) e redução do tempo de permanência na área inferior (Fig. 2D) em animais não submetidos ao ECI ($p < 0,0001$).

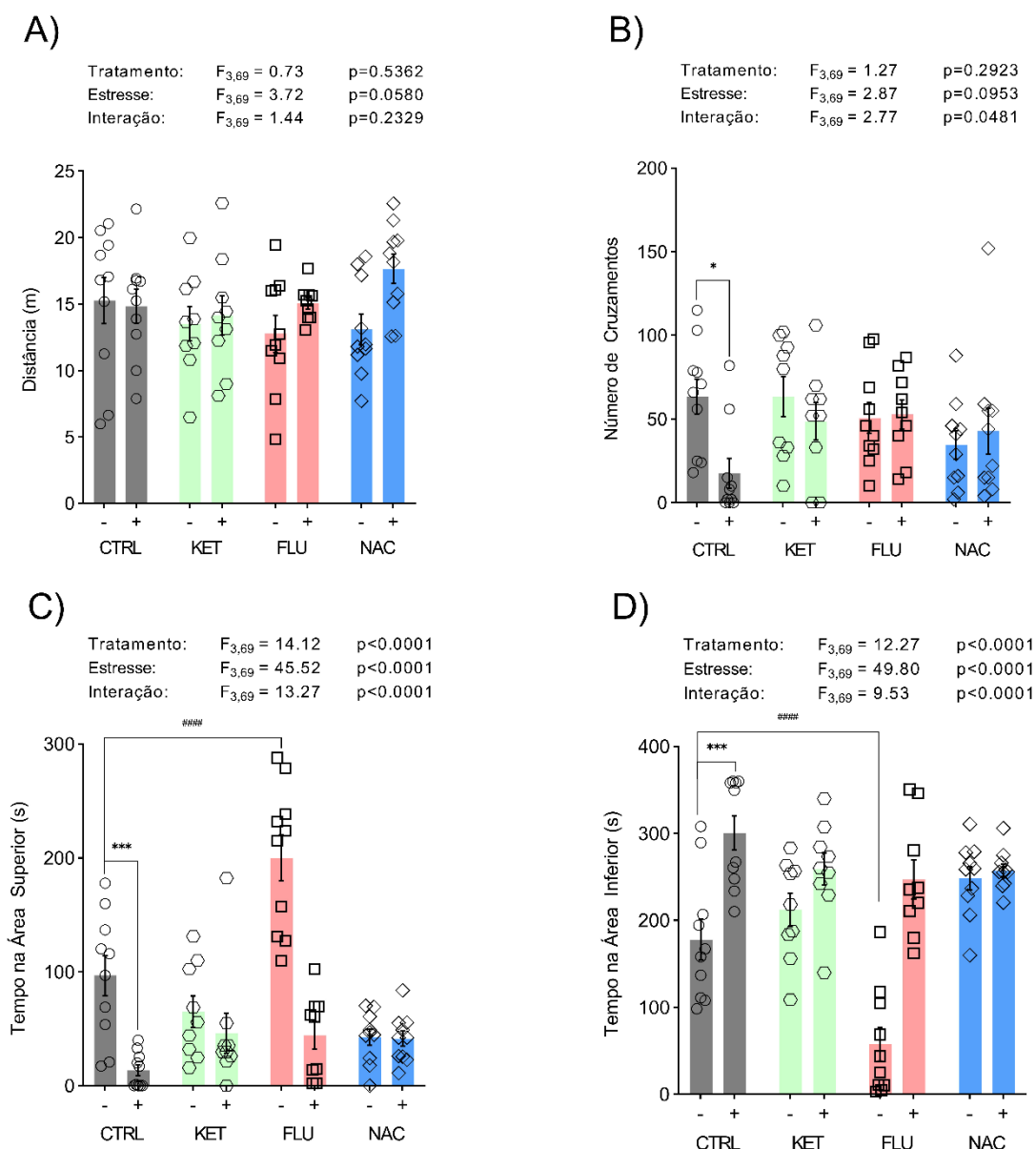


Figura 2. Efeitos do tratamento com NAC, FLU e KET em peixes-zebra submetidos ao protocolo de ECI. A) distância percorrida (m). B) número de cruzamentos. C) tempo na área superior (s). D) tempo na área inferior (s). CTRL: grupo controle. FLU: fluoxetina; KET: cetamina; NAC: N-acetilcisteína; +: grupo estressado; -: grupo não estressado. n = 9-10.

DISCUSSÃO

Aqui, demonstramos pela primeira vez que a N-acetilcisteína (NAC) é capaz de atenuar de forma sustentada o comportamento do tipo-ansiosígeno induzido pelo protocolo de estresse crônico imprevisível (ECI), após uma única intervenção farmacológica. Como esperado, o ECI induziu comportamento do tipo-ansioso nos animais sem causar prejuízo locomotor, reduzindo o tempo de permanência na área superior e o número de cruzamento entre as áreas do aparato, bem como aumentando o tempo de permanência na área inferior, sem alterar a distância

percorrida¹².

No teste de tanque novo (NTT), a distância total percorrida e o número de cruzamentos entre as áreas (superior, média e inferior) do aparato são usados como indicadores de atividade locomotora, enquanto o tempo reduzido na área superior e o tempo aumentado na área inferior do aparato servem como indicadores de comportamento do tipo ansioso^{12, 28-30}. Protocolos de estresse crônico em modelos animais são ferramentas úteis para replicar os fenótipos observados em pacientes com transtornos mentais³¹. Em peixes-zebra, o ECI induz alterações comportamentais, neuroquímicas e moleculares semelhantes às manifestações clínicas de pacientes com transtornos como ansiedade e depressão. Estudos anteriores mostram que antidepressivos e ansiolíticos podem mitigar os efeitos do estresse crônico em peixes-zebra^{12,32-33}. Nosso estudo mostra que o ECI reduziu o tempo gasto na área superior e aumentou o tempo gasto na área inferior no NTT, corroborando e reforçando estudos anteriores que demonstraram que o ECI induz comportamento do tipo-ansioso em peixes-zebra^{12,32,34}.

A NAC não induziu prejuízo locomotor no NTT, uma vez que não se observou redução na distância total percorrida nem no número de cruzamentos entre área, indicando ausência de possíveis efeitos tóxicos nesses aspectos em modelo animal. Estudos demonstram que a NAC foi capaz de atenuar o comportamento tipo-ansioso induzido pelo ECI em peixes-zebra após 7 dias de tratamento, entretanto, não induziu comportamento tipo-ansiolítico em animais não estressados¹². Em consonância, aqui observamos que a NAC não induziu comportamento tipo-ansiolítico em peixes-zebra não estressados, evidenciado pela ausência de aumento no tempo de permanência na área superior do aparato. Ademais, a exposição a 10 mg/L de NAC por 20 minutos atenuou o comportamento tipo-ansio gênico induzido pelo ECI, destacando seu potencial para efeitos sustentados em transtornos mentais relacionados ao estresse após uma única intervenção farmacológica. Os efeitos da NAC neste estudo sugerem um papel importante do estresse oxidativo e da excitotoxicidade na patogênese do comportamento semelhante à ansiedade, uma vez que a NAC atua principalmente nessas vias^{7-8,10,32}. Nosso grupo demonstrou anteriormente que a atividade antioxidante da NAC é um dos possíveis mecanismos pelos quais ela reverte o efeito tipo-ansio gênico induzido pelo ECI em peixes-zebra¹². Além disso, evidências sugerem que a NAC pode também interagir com receptores metabotrópicos de glutamato dos tipos 2 e 3, e com os receptores ionotrópicos do glutamato (AMPA e NMDA), reduzindo a excitotoxicidade - que contribui para a fisiopatologia dos transtornos relacionados ao estresse^{9,35-38}.

Este estudo destaca o potencial do efeito sustentado da NAC para a ansiedade em modelo animal, em contraste com os tratamentos atuais em humanos, que normalmente levam

semanas ou meses para produzir resultados³⁹. Dada a eficácia da NAC em reverter de forma sustentada o comportamento do tipo-ansioso induzido pelo ECI neste estudo, isso reforça a possibilidade de que esse medicamento possa servir como um agente promissor para o tratamento de transtornos mentais relacionados ao estresse. Diversos outros estudos clínicos randomizados demonstram relevantes efeitos positivo do uso da NAC no tratamento de transtorno por dependência de cannabis⁴⁰, transtorno bipolar e depressivo⁴¹⁻⁴², transtorno de espectro autista⁴³, além de estudos que avaliaram a NAC como adjuvante ao tratamento do tabagismo e outras substâncias de abuso⁴⁴⁻⁴⁵ e esquizofrenia⁴⁶, resultando especialmente em ausência de prejuízos aos pacientes, sejam cognitivos ou de efeitos colaterais. Apesar disso, cabe ressaltar que estudos conduzidos em humanos carecem de padronização no tratamento, espaço amostral amplo para aumentar o poder do estudo e são, em geral, resultados de estudos retrospectivos, série de casos ou pequenos ensaios clínicos, o que dificulta a extrapolação dos resultados por conta de uma validade externa prejudicada³⁶.

A cetamina (KET) é um anestésico dissociativo utilizado em ambientes médicos tanto para indução quanto para manutenção da anestesia. Além disso, é utilizada como tratamento para depressão maior e manejo da dor intensa. Um enantiômero da cetamina - a esketamina, comercialmente vendida como spray nasal - é utilizado como antidepressivo para pacientes com depressão maior refratários aos tratamentos. A cetamina atua como um bloqueador de canal dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos N-Metil-D-Aspartato (NMDA)^{39,47}. A identificação de seus efeitos antidepressivos rápidos em pacientes com depressão resistente ao tratamento abriu caminho para novos tratamentos eficazes para transtornos do humor, ainda que com efeitos adversos significativos e importante indução de dependência⁴⁸. A KET já demonstrou efeitos rápidos e sustentados, conforme descrito na literatura para roedores e humanos⁴⁹⁻⁵⁰. No entanto, demonstramos pela primeira vez que a KET é capaz de atenuar o efeito tipo-ansiosgênico de forma sustentada após uma única intervenção farmacológica em peixes-zebra.

Quanto ao efeito ansiolítico da fluoxetina (FLU), demonstramos pela primeira vez que esse efeito é sustentado após exposição única. Estudos anteriores indicam que a FLU induz um efeito ansiolítico após exposição aguda⁵¹. No entanto, neste estudo, mostramos que os efeitos ansiolíticos do FLU não são observados em animais estressados, embora atenuem o comportamento semelhante à ansiedade induzido pelo ECI. Em investigações anteriores conduzidas por nosso grupo, demonstramos que a FLU mitigou os efeitos do ECI. No entanto, a exposição foi crônica por 7 dias e não induziu efeitos ansiolíticos³².

As limitações deste estudo envolvem um n pequeno para a análise de cada um dos grupos, o uso de somente parâmetros comportamentais para a análise ansiolítica dos

medicamentos propostos e a existência de pontos aberrantes na análise comportamental.

Conclui-se que o efeito sustentado da NAC em atenuar do comportamento do tipo-ansioso induzido pelo ECI em nosso estudo, bem como estudos na literatura que corroboram com a eficácia da NAC como tratamento adjuvante em diferentes transtornos mentais, juntamente com seu perfil de segurança e tolerabilidade favorável em humanos, além do baixo custo, ressaltam seu potencial de aplicabilidade em transtornos neuropsiquiátricos, principalmente os relacionados ao estresse. Apesar da neurobiologia dos transtornos mentais ainda ser obscura, estudos visam elucidar novos alvos terapêuticos, bem como identificar novos mecanismos de ação de medicamentos com potencial aplicabilidade e eficácia em transtornos mentais. Por fim, mais ensaios clínicos randomizados multicêntricos e de grande porte são necessários para que surjam recomendações mais robustas acerca da utilização da NAC em humanos. É importante enfatizar que são necessários mais estudos para investigar os possíveis mecanismos subjacentes aos efeitos sustentados da NAC.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Matheus Ricardo Hoffmann de Souza e Cristine Somavilla Fagundes pelo apoio prestado na realização dos experimentos desenvolvidos neste trabalho.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Bruno Zilli Peroni e Ricieri Naue Mocelin participaram de todas as etapas da concepção, delineamento, aquisição, análise e interpretação dos dados, escrita do artigo e aprovaram a versão final do trabalho.

FINANCIAMENTO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (21/2551-0000618-8) e Universidade Federal da Fronteira Sul (PES-2022-0330).

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores não possuem nenhum conflito de interesse a declarar.

REFERÊNCIAS

1. Alvi T, Kumar D, Tabak BA. Social anxiety and behavioral assessments of social cognition: A systematic review. *J Affect Disord.* 2022. 15 (311):17-30. doi: 10.1016/j.jad.2022.04.130
2. Insel TR, Voon V, Nye JS, Brown VJ, Altevogt BM, Bullmore ET, et al. Innovative

solutions to novel drug development in mental health. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013. 37 (10): 2438-44. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.03.022

3. Patel V, Saxena S, Lund C, Thornicroft G, Baingana F, Bolton P, et al. The Lancet Commission on global mental health and sustainable development. *Lancet.* 2018. 392 (10157): 1553-1598. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31612-X

4. Walker ER, McGee RE, Druss BG. Mortality in mental disorders and global disease burden implications: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Psychiatry.* 2015. 72 (4): 334-41. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2014.2502

5. Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Saúde mental deve estar no topo da agenda política pós-COVID-19, diz relatório da OPAS. OPAS: Washington, 2019. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/noticias/9-6-2023-saude-mental-deve-estar-no-topo-da-agenda-politica-pos-covid-19-diz-relatorio-da#:~:text=Em%202020%2C%20durante%20a%20pandemia,14%25%20no%20in%C3%ADcio%20de%202023>>. Acesso em: 12 abr. 2024.

6. Minarini A, Ferrari S, Galletti M, Giambalvo N, Perrone D, Rioli G, et al. N-acetylcysteine in the treatment of psychiatric disorders: current status and future prospects. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2017. 13 (3): 279-292. doi: 10.1080/17425255.2017.1251580

7. Berk M, Malhi GS, Gray LJ, Dean OM. The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. *Trends Pharmacol Sci.* 2013. 34 (3): 167-77. doi: 10.1016/j.tips.2013.01.001

8. Bradlow RCJ, Berk M, Kalivas PW, Back SE, Kanaan RA. The Potential of N-Acetyl-L-Cysteine (NAC) in the Treatment of Psychiatric Disorders. *CNS Drugs.* 2022. 36 (5): 451-482. doi: 10.1007/s40263-022-00907-3

9. Dean O, Giorlando F, Berk M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *J Psychiatry Neurosci.* 2011. 36 (2): 78-86. doi: 10.1503/jpn.100057

10. Raghu G, Berk M, Campochiaro PA, Jaeschke H, Marenzi G, Richeldi L, et al. The Multifaceted Therapeutic Role of N-Acetylcysteine (NAC) in Disorders Characterized by Oxidative Stress. *Curr Neuropharmacol.* 2021. 19 (8): 1202-1224. doi: 10.2174/1570159X19666201230144109

11. Reis CG, Mocelin R, Benvenuti R, Marcon M, Sachett A, Herrmann AP, et al. Effects of N-acetylcysteine amide on anxiety and stress behavior in zebrafish. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol.* 2020. 393 (4): 591-601. doi: 10.1007/s00210-019-01762-8

12. Mocelin R, Marcon M, D'ambros S, Mattos J, Sachett A, Siebel AM, et al. N-Acetylcysteine Reverses Anxiety and Oxidative Damage Induced by Unpredictable Chronic Stress in Zebrafish. *Mol Neurobiol.* 2019. 56 (2): 1188-1195. doi: 10.1007/s12035-018-1165-y

13. Tardiolo G, Bramanti P, Mazzon E. Overview on the Effects of N-Acetylcysteine in Neurodegenerative Diseases. *Molecules.* 2018. 23 (12): 3305. doi: 10.3390/molecules23123305

14. Turkmen R, Birdane YO, Demirel HH, Yavuz H, Kabu M, Ince S. Antioxidant and cytoprotective effects of N-acetylcysteine against subchronic oral glyphosate-based herbicide-induced oxidative stress in rats. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2019. 26 (11): 11427-11437. doi: 10.1007/s11356-019-04585-5

15. Pedre B, Barayeu U, Ezeriņa D, Dick TP. The mechanism of action of N-acetylcysteine (NAC): The emerging role of H₂S and sulfane sulfur species. *Pharmacol Ther.* 2021. 228. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.107916

16. Bavarsad Shahripour R, Harrigan MR, Alexandrov AV. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain Behav.* 2014. 4 (2): 108-22. doi: 10.1002/brb3.208

17. Kalueff AV, Stewart AM, Gerlai R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 2014. 35 (2): 63-75. doi: 10.1016/j.tips.2013.12.002
18. Faria M, Prats E, Gómez-Canela C, Hsu CY, Arick MA 2nd, Bedrossiantz J, et al. Therapeutic potential of N-acetylcysteine in acrylamide acute neurotoxicity in adult zebrafish. *Sci Rep.* 2019. 9 (1): 16467. doi: 10.1038/s41598-019-53154-w
19. Linck VM, Costa-Campos L, Pilz LK, Garcia CR, Elisabetsky E. AMPA glutamate receptors mediate the antidepressant-like effects of N-acetylcysteine in the mouse tail suspension test. *Behav Pharmacol.* 2012. 23 (2): 171-7. doi: 10.1097/FBP.0b013e3283512c3a
20. Mocelin R, Marcon M, D'ambros S, Herrmann AP, da Rosa Araujo AS, Piato A. Behavioral and Biochemical Effects of N-Acetylcysteine in Zebrafish Acutely Exposed to Ethanol. *Neurochem Res.* 2018. 43 (2): 458-464. doi: 10.1007/s11064-017-2442-2
21. Gallas-Lopes M, Bastos LM, Benvenuti R, Panzenhagen AC, Piato A, Herrmann AP. Systematic review and meta-analysis of 10 years of unpredictable chronic stress in zebrafish. *Lab Anim (NY).* 2023. 52 (10): 229-246. doi: 10.1038/s41684-023-01239-5
22. Michelotti P, Quadros VA, Pereira ME, Rosemberg DB. Ketamine modulates aggressive behavior in adult zebrafish. *Neurosci Lett.* 2018. 25 (684): 164-168. doi: 10.1016/j.neulet.2018.08.009
23. Nuara SG, Gourdon JC, Huot P. Evaluation of the effects of the mGlu_{2/3} antagonist LY341495 on dyskinesia and psychosis-like behaviours in the MPTP-lesioned marmoset. *Pharmacol Rep.* 2022. 74 (4): 614-625. doi: 10.1007/s43440-022-00378-9
24. Riehl R, Kyzar E, Allain A, Green J, Hook M, Monnig L, et al. Behavioral and physiological effects of acute ketamine exposure in adult zebrafish. *Neurotoxicol Teratol.* 2011. 33 (6): 658-67. doi: 10.1016/j.ntt.2011.05.011
25. Seo MK, Lee JA, Jeong S, Seog DH, Lee JG, Park SW. Effects of Chronic LY341495 on Hippocampal mTORC1 Signaling in Mice with Chronic Unpredictable Stress-Induced Depression. *Int J Mol Sci.* 2022. 23 (12):6416. doi: 10.3390/ijms23126416
26. Witkin JM, Monn JA, Schoepp DD, Li X, Overshiner C, Mitchell SN, et al. The Rapidly Acting Antidepressant Ketamine and the mGlu_{2/3} Receptor Antagonist LY341495 Rapidly Engage Dopaminergic Mood Circuits. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016. 358 (1): 71-82. doi: 10.1124/jpet.116.233627
27. Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, et al. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol.* 2020. 18 (7): e3000411. doi: 10.1371/journal.pbio.3000411
28. Collier, A.D., Kalueff, A.V., Echevarria, D.J. (2017). Zebrafish Models of Anxiety-Like Behaviors. In: Kalueff, A. (eds) *The rights and wrongs of zebrafish: Behavioral phenotyping of zebrafish.* Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33774-6_3
29. Kysil EV, Meshalkina DA, Frick EE, Echevarria DJ, Rosemberg DB, Maximino Cet al. Comparative Analyses of Zebrafish Anxiety-Like Behavior Using Conflict-Based Novelty Tests. *Zebrafish.* 2017 Jun;14(3):197-208. doi: 10.1089/zeb.2016.1415. Epub 2017 May 1. PMID: 28459655.
30. Pittman, J., Piato, A. (2017). Developing Zebrafish Depression-Related Models. In: Kalueff, A. (eds) *The rights and wrongs of zebrafish: Behavioral phenotyping of zebrafish.* Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33774-6_2
31. Willner P. The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiol Stress.* 2016 Aug 24;6:78-93. doi: 10.1016/j.ynstr.2016.08.002. PMID: 28229111; PMCID: PMC5314424.
32. Marcon M, Mocelin R, Benvenuti R, Costa T, Herrmann AP, de Oliveira DL, Koakoski G, Barcellos LJG, Piato A. Environmental enrichment modulates the response to chronic stress in zebrafish. *J Exp Biol.* 2018 Feb 22;221(Pt 4):jeb176735. doi: 10.1242/jeb.176735.

PMID: 29361609.

33. Song C, Liu BP, Zhang YP, Peng Z, Wang J, Collier AD, et al. Modeling consequences of prolonged strong unpredictable stress in zebrafish: Complex effects on behavior and physiology. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018 Feb 2;81:384-394. doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.08.021. Epub 2017 Aug 26. PMID: 28847526.

34. Piato ÂL, Capiotti KM, Tamborski AR, Osés JP, Barcellos LJ, Bogo MR, Lara DR, Vianna MR, Bonan CD. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2011 Mar 30;35(2):561-7. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.12.018. Epub 2010 Dec 25. PMID: 21187119.

35. Chen YW, Lin HC, Ng MC, Hsiao YH, Wang CC, Gean PW, et al. Activation of mGluR2/3 underlies the effects of N-acetylcystein on amygdala-associated autism-like phenotypes in a valproate-induced rat model of autism. *Front Behav Neurosci*. 2014 Jun 17;8:219. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00219. PMID: 24987341; PMCID: PMC4060031.

36. Deepmala, Slattery J, Kumar N, Delhey L, Berk M, Dean O, et al. Clinical trials of N-acetylcysteine in psychiatry and neurology: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015 Aug;55:294-321. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.04.015. Epub 2015 May 6. PMID: 25957927.

37. Niswender CM, Conn PJ. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010;50:295-322. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533. PMID: 20055706; PMCID: PMC2904507.

38. Sha Z, Xu J, Li N, Li O. Regulatory Molecules of Synaptic Plasticity in Anxiety Disorder. *Int J Gen Med*. 2023 Jul 6;16:2877-2886. doi: 10.2147/IJGM.S413176. PMID: 37435365; PMCID: PMC10332425.

39. Zanos P, Moaddel R, Morris PJ, Georgiou P, Fischell J, Elmer GI, Alkondon M, Yuan P, Pribut HJ, Singh NS, Dossou KS, Fang Y, Huang XP, Mayo CL, Wainer IW, Albuquerque EX, Thompson SM, Thomas CJ, Zarate CA Jr, Gould TD. NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature*. 2016 May 26;533(7604):481-6. doi: 10.1038/nature17998. Epub 2016 May 4. PMID: 27144355; PMCID: PMC4922311.

40. Sharma R, Tikka SK, Bhute AR, Bastia BK. N-acetyl cysteine in the treatment of cannabis use disorder: A systematic review of clinical trials. *Addict Behav*. 2022 Jun;129:107283. doi: 10.1016/j.addbeh.2022.107283. Epub 2022 Feb 16. PMID: 35189496.

41. Peng TR, Lin HH, Tseng TL, Huang YH, Tsai PY, Lin CY, et al. Efficacy of N-acetylcysteine for patients with depression: An updated systematic review and meta-analysis. *Gen Hosp Psychiatry*. 2024 Nov-Dec;91:151-159. doi: 10.1016/j.genhosppsy.2024.10.018. Epub 2024 Nov 3. PMID: 39504621.

42. Nery FG, Li W, DelBello MP, Welge JA. N-acetylcysteine as an adjunctive treatment for bipolar depression: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Bipolar Disord*. 2021 Nov;23(7):707-714. doi: 10.1111/bdi.13039. Epub 2021 Jan 15. PMID: 33354859.

43. Lee TM, Lee KM, Lee CY, Lee HC, Tam KW, Loh EW. Effectiveness of N-acetylcysteine in autism spectrum disorders: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Aust N Z J Psychiatry*. 2021 Feb;55(2):196-206. doi: 10.1177/0004867420952540. Epub 2020 Sep 8. PMID: 32900213.

44. Arancini L, Mohebbi M, Berk M, Dean OM, Bortolaschi CC, Spolding B, et al. A placebo-controlled, randomised pilot trial of N-acetylcysteine or placebo for cessation of tobacco smoking. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2021 Dec;53:120-126. doi: 10.1016/j.euroneuro.2021.10.002. Epub 2021 Oct 31. PMID: 34757312.

45. Cuocina M, Aiello G, Cutrufelli P, Rampello M, Rapisarda L, Rodolico A, et al. Effect of N-acetylcysteine on craving in substance use disorders (SUD): a meta-analysis of randomized controlled trials. *Front Pharmacol*. 2024 Sep 6;15:1462612. doi: 10.3389/fphar.2024.1462612.

PMID: 39309000; PMCID: PMC11412889.

46. Yolland CO, Hanratty D, Neill E, Rossell SL, Berk M, Dean OM, et al. Meta-analysis of randomised controlled trials with *N*-acetylcysteine in the treatment of schizophrenia. *Aust N Z J Psychiatry*. 2020 May;54(5):453-466. doi: 10.1177/0004867419893439. Epub 2019 Dec 11. PMID: 31826654.

47. Zanos P, Thompson SM, Duman RS, Zarate CA Jr, Gould TD. Convergent Mechanisms Underlying Rapid Antidepressant Action. *CNS Drugs*. 2018 Mar;32(3):197-227. doi: 10.1007/s40263-018-0492-x. PMID: 29516301; PMCID: PMC6005380.

48. Krystal JH, Kavalali ET, Monteggia LM. Ketamine and rapid antidepressant action: new treatments and novel synaptic signaling mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. 2024 Jan;49(1):41-50. doi: 10.1038/s41386-023-01629-w. Epub 2023 Jul 24. PMID: 37488280; PMCID: PMC10700627.

49. Ma, S., Chen, M., Jiang, Y. *et al.* Sustained antidepressant effect of ketamine through NMDAR trapping in the LHb. *Nature* **622**, 802–809 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06624-1>

50. Rawat R, Tunc-Ozcan E, Dunlop S, Tsai YH, Li F, Bertossi R, Peng CY, Kessler JA. Ketamine's rapid and sustained antidepressant effects are driven by distinct mechanisms. *Cell Mol Life Sci*. 2024 Feb 27;81(1):105. doi: 10.1007/s00018-024-05121-6. PMID: 38413417; PMCID: PMC10899278.

51. Mocelin R, Herrmann AP, Marcon M, Rambo CL, Rohden A, Bevilacqua F, et al. *N*-acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav*. 2015 Dec;139 Pt B:121-6. doi: 10.1016/j.pbb.2015.08.006. Epub 2015 Aug 7. PMID: 26261019.

LEGENDA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho experimental. CTRL: grupo controle. ECI: estresse crônico imprevisível; FLU: fluoxetina; KET: cetamina; NAC: N-acetilcisteína; +: grupo estressado; D1: dia 01; D7: dia 07; D8: dia 08; TTO: tratamento. n = 9-10.

Figura 2. Efeitos do tratamento com NAC, FLU e KET em peixes-zebra submetidos ao protocolo de ECI. A) distância percorrida (m). B) número de cruzamentos. C) tempo na área superior (s). D) tempo na área inferior (s). CTRL: grupo controle. FLU: fluoxetina; KET: cetamina; NAC: N-acetilcisteína; +: grupo estressado; -: grupo não estressado. n = 9-10.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após a execução do projeto de pesquisa, processamento dos dados e elaboração do artigo, conclui-se que os objetivos iniciais do projeto de pesquisa foram parcialmente atingidos, tendo em vista que demonstramos os efeitos comportamentais do protocolo de Estresse Crônico Imprevisível (ECI) por 7 dias em peixes-zebra, bem como comprovamos o efeito tipo ansiolítico da N-acetilcisteína (NAC) em atenuar os efeitos comportamentais induzidos pelo protocolo de ECI, porém, por razões explicitadas no relatório de pesquisa, não conseguimos avaliar os efeitos do antagonismo da NAC induzida por antagonista de receptor mGluR2 (LY341495). Apesar disso, considera-se que os objetivos pertinentes aos Componentes Curriculares (CCr) Trabalho de Curso I, II e III foram atingidos a partir da elaboração e realização de uma pesquisa científica.

Identificou-se que o protocolo de ECI reduziu o número de cruzamentos e tempo de permanência na área superior, e aumentou o tempo de permanência na inferior, sendo compatível com um efeito tipo-ansiogênico nos peixes-zebra. Todos os tratamentos (NAC, fluoxetina e cetamina) atenuaram o efeito ansiogênico induzido pelo ECI. Dado o efeito positivo da NAC em nosso estudo, seu bom perfil de segurança e baixo custo, bem como dados já existentes em ensaios clínicos randomizados em seres humanos, infere-se que ela emerge no tratamento de transtornos neuropsiquiátricos.

Os dados obtidos a partir deste estudo serão utilizados em conjunto com dados a serem obtidos futuramente na continuidade desta pesquisa, dentro de um estudo maior a ser publicado na Revista *Neuropsychopharmacology*, em artigo intitulado “Efeito tipo-ansiolítico sustentado da N-acetilcisteína em peixes-zebra submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível”.