

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
***CAMPUS* PASSO FUNDO**
CURSO DE MEDICINA

MATHEUS RICARDO HOFFMANN DE SOUZA

ANÁLISE BIOQUÍMICA DO EFEITO NEUROPROTETOR DA
N-ACETILCISTEÍNA EM PEIXES-ZEBRA

PASSO FUNDO, RS

2026

MATHEUS RICARDO HOFFMANN DE SOUZA

**ANÁLISE BIOQUÍMICA DO EFEITO NEUROPROTETOR DA
N-ACETILCISTEÍNA EM PEIXES-ZEBRA**

Trabalho de Curso de Graduação apresentado à
Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Passo
Fundo, RS, como requisito parcial para a obtenção do
título de Médico.

Orientador: Prof. Dr. Ricieri Mocelin

PASSO FUNDO, RS

2026

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

'
ANÁLISE BIOQUÍMICA DO EFEITO NEUROPROTETOR DA
N-ACETILCISTEÍNA EM PEIXES-ZEBRA / . -- 2026.
76 f.:il.

Orientador: Dr. Ricieri Mocelin

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Medicina, Passo Fundo, RS, 2026.

1. Estresse Oxidativo. 2. Transtornos Mentais. 3.
Peixes-zebra. I. Mocelin, Ricieri, 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).

MATHEUS RICARDO HOFFMANN DE SOUZA

**ANÁLISE BIOQUÍMICA DO EFEITO NEUROPROTETOR DA
N-ACETILCISTEÍNA EM PEIXES-ZEBRA**

Trabalho de Curso de Graduação apresentado à
Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Passo
Fundo, RS, como requisito parcial para a obtenção do
título de Médico.

Este Trabalho de Curso foi defendido e aprovado pela banca examinadora em 16/06/2026.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricieri Mocelin
Orientador

Prof^ª. Me. Bruna Chaves Lopes
Universidade Federal da Fronteira Sul

Prof^ª. Esp. Michelli Finger
Universidade de Passo Fundo

APRESENTAÇÃO

Este estudo corresponde ao Trabalho de Curso de Graduação, elaborado pelo acadêmico Matheus Ricardo Hoffmann de Souza, como requisito parcial para a obtenção do título de Médico pela Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *Campus* Passo Fundo (RS) sob a orientação do Prof. Dr. Ricieri Naue Mocelin. O objetivo do projeto foi investigar o efeito neuroprotetor da N-Acetilcisteína em peixes-zebra, por meio de um modelo de Estresse Crônico Imprevisível (ECI). O desenvolvimento do trabalho ocorreu ao longo de três semestres acadêmicos, distribuídos em três etapas: no primeiro semestre de 2025, quinta fase do curso de Medicina, foi elaborado o projeto de pesquisa no contexto do Componente Curricular Regular (CCR) de Trabalho de Curso I. Em seguida, no segundo semestre de 2025, durante a sexta fase, foram realizados os experimentos previstos no projeto de pesquisa, com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), e elaboração do relatório de atividades, dentro do escopo do CCR de Trabalho de Curso II. Por fim, a terceira etapa, que envolveu a redação de um artigo científico, a apresentação final e a conclusão do CCR de Trabalho de Curso III, foi realizada no primeiro semestre de 2026.

RESUMO

É amplamente aceita a ideia de que o estresse é um fator importante no desencadeamento de transtornos mentais, como a ansiedade. O estresse crônico é um potente indutor de dano oxidativo no sistema nervoso central, sendo a peroxidação lipídica um dos marcadores biológicos mais deletérios dessa condição. Este estudo investigou o efeito protetor da N-acetilcisteína (NAC), com foco exclusivo na integridade das membranas lipídicas encefálicas de peixes-zebra submetidos ao estresse crônico imprevisível (ECI) por 7 dias. Os animais foram submetidos ao protocolo de ECI durante 7 dias aos seguintes agentes estressores em horários e dias alternados: perseguição por rede, aquecimento ou resfriamento da água, aglomeração, três trocas consecutivas de tanque e exposição do dorso. No 7º dia, além da exposição ao estresse, os peixes foram submetidos ao tratamento ou não por imersão em N-acetilcisteína (NAC), fluoxetina (FLU) ou cetamina (KET) durante 20 minutos. 24 horas após o tratamento, os animais foram anestesiados e eutanasiados por resfriamento rápido, e o encéfalo foi coletado, preparado e armazenado para análise bioquímica. O dano oxidativo foi quantificado por meio dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Nossos resultados demonstraram que o ECI promoveu um aumento robusto e significativo nos níveis de TBARS, indicando uma degradação severa dos lipídios de membrana no encéfalo. O tratamento com NAC, fluoxetina (FLU) ou cetamina (KET) não induziu dano lipídico em animais não estressados, entretanto, os tratamentos com FLU e KET não foram capazes de reverter a peroxidação lipídica em animais estressados. Apesar disso, o tratamento com NAC reverteu de forma sustentada o dano lipídico causado pelo ECI. Estes dados evidenciam que a NAC pode atuar de forma sustentada após uma exposição farmacológica, atuando como um agente neuroprotetor em transtornos mentais relacionados ao estresse, impedindo especificamente a lipoperoxidação decorrente do estresse prolongado.

Palavras-chave: Peixe-zebra; N-acetilcisteína; Estresse Crônico Imprevisível; Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

The idea that stress is a major factor in the onset of mental disorders, such as anxiety, is widely accepted. Chronic stress is a potent inducer of oxidative damage in the central nervous system, with lipid peroxidation representing one of the most deleterious biological markers of this condition. This study investigated the protective effect of N-acetylcysteine (NAC) on the integrity of brain lipid membranes in zebrafish subjected to chronic unpredictable stress (CUS) for 7 days. Animals were exposed to the CUS protocol for 7 days using the following stressors applied on alternating days and at varying times: net chasing, water heating or cooling, crowding, three consecutive tank changes, and dorsal body exposure. On day 7, in addition to stress exposure, fish were either treated or not treated by immersion in N-acetylcysteine (NAC), fluoxetine (FLU), or ketamine (KET) for 20 minutes. Twenty-four hours after treatment, the animals were anesthetized and euthanized by rapid cooling, and the brain tissue was collected, processed, and stored for biochemical analysis. Oxidative damage was quantified by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels. Our results demonstrated that CUS induced a robust, significant increase in TBARS levels, indicating severe degradation of brain membrane lipids. Treatment with NAC, FLU, or KET did not induce lipid damage in non-stressed animals; however, FLU and KET treatments were unable to reverse lipid peroxidation in stressed animals. In contrast, NAC treatment sustainably reversed the lipid damage caused by CUS. These findings demonstrate that NAC may exert sustained effects following a single pharmacological exposure, acting as a neuroprotective agent in stress-related mental disorders by specifically preventing lipid peroxidation resulting from prolonged stress.

Keywords: Zebrafish; N-acetylcysteine; Unpredictable Chronic Stress; Oxidative Stress.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. DESENVOLVIMENTO.....	10
2.1. PROJETO DE PESQUISA.....	10
2.1.1. Tema.....	10
2.1.2. Problemas.....	10
2.1.3. Hipóteses.....	10
2.1.4. Objetivos.....	11
2.1.4.1. Objetivo geral.....	11
2.1.4.2. Objetivos específicos.....	11
2.1.5 Justificativa.....	11
2.1.6 Referencial Teórico.....	13
2.1.6.1 N-Acetilcisteína.....	13
2.1.6.2 Peixe-zebra.....	14
2.1.6.3 Biomarcadores de Estresse Oxidativo.....	14
2.1.6.4 Transtornos Mentais.....	15
2.1.7 Metodologia.....	17
2.1.7.1 Tipo de estudo.....	17
2.1.7.2 Local e período.....	17
2.1.7.3 População e amostragem.....	17
2.1.7.4 Variáveis e coleta de dados.....	18
2.1.7.5 Análise estatística.....	20
2.1.7.6 Ética e biossegurança.....	21
2.1.8 Recursos.....	21
2.1.9 Cronograma.....	21
2.1.10 Referências.....	21
ANEXO A – PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO ATRAVÉS DA QUANTIFICAÇÃO DAS ENZIMAS SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD), CATALASE (CAT), GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST), GLUTATIONA REDUZIDA (GSH).....	24
ANEXO B – PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO ATRAVÉS DA QUANTIFICAÇÃO DA ENZIMA GLUTATIONA REDUTASE (GR).....	35
ANEXO C – PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO ATRAVÉS DA QUANTIFICAÇÃO DA ENZIMA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx).....	41
ANEXO D – PROTOCOLO DE MEDIDA DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) E O DANO OXIDATIVO ÀS PROTEÍNAS PELOS NÍVEIS DE GRUPOS TIÓIS PROTEICOS (SH) E NÃO PROTEICOS (NPSH).....	50
ANEXO E - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE ÉTICA (CEUA).....	57
ANEXO F - EMENDA DE PRORROGAÇÃO (CEUA).....	58
3. RELATÓRIO DE PESQUISA.....	59
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	61
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75

1. INTRODUÇÃO

Os transtornos mentais, em especial a depressão e a ansiedade, figuram entre as condições médicas mais prevalentes, constituindo um desafio substancial para a saúde pública global (Patel *et al.*, 2018; Walker *et al.*, 2015). Estima-se que, em 2015, mais de 300 milhões de pessoas, correspondentes a 4,4% da população mundial, fossem afetadas pela depressão, enquanto 264 milhões, ou 3,6% da população, sofressem de transtornos de ansiedade (*World Health Organization*, 2017). Esses dados evidenciam a magnitude desses transtornos e ressaltam a urgência de estratégias eficazes de prevenção e de tratamento (OPAS, 2019).

Evidências substanciais indicam que o estresse oxidativo desempenha um papel central na fisiopatologia de transtornos mentais, como a depressão e a ansiedade. O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante do organismo pode ocasionar danos celulares e disfunções neurais, refletindo-se, por exemplo, em alterações do humor e da cognição (Mocelin *et al.*, 2019). Pacientes com transtornos depressivos frequentemente apresentam níveis reduzidos de antioxidantes, como a superóxido dismutase e a glutatona, além de marcadores elevados de peroxidação lipídica e danos ao DNA, sugerindo que o aumento do estresse oxidativo está intimamente relacionado à gravidade dos sintomas psiquiátricos (Raghu *et al.*, 2021).

Considerando o impacto do estresse oxidativo na fisiopatologia dos transtornos mentais, a N-acetilcisteína (NAC) tem sido investigada como uma estratégia terapêutica promissora devido às suas propriedades antioxidantes e moduladoras da neurotransmissão (Berk *et al.*, 2013; Dean *et al.*, 2011). Atuando como precursor da glutatona, um dos principais antioxidantes celulares, a NAC contribui para a redução do estresse oxidativo e da inflamação, processos frequentemente alterados em pacientes psiquiátricos (Mocelin *et al.*, 2019). Além disso, estudos sugerem que a NAC pode modular sistemas neurotransmissores, como o glutamatérgico, crucial para a regulação do humor e da resposta ao estresse (Mocelin *et al.*, 2018). Tais descobertas reforçam a relevância da NAC como intervenção terapêutica.

O peixe-zebra (*Danio rerio*) tem se consolidado como um modelo versátil e relevante para o estudo de doenças neurodegenerativas, devido à sua alta conservação genética em relação aos seres humanos, à transparência nos estágios iniciais de desenvolvimento e à facilidade de manipulação genética (Kalueff *et al.*, 2014). Estudos recentes destacam que esse organismo é capaz de recapitular características fenotípicas e moleculares de diversos transtornos neurodegenerativos, permitindo a investigação de vias patológicas comuns e a triagem de compostos neuroprotetores com maior precisão translacional (Mocelin *et al.*, 2018;

Reis *et al.*, 2020). Essa aplicabilidade torna o peixe-zebra uma ferramenta poderosa para o avanço da neurociência pré-clínica e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras.

Nesse sentido, este estudo busca avaliar os efeitos da NAC sobre marcadores de estresse oxidativo e sobre o comportamento relacionados à ansiedade e à depressão no modelo experimental do peixe-zebra. Ao investigar a influência da NAC na modulação do estresse oxidativo e dos sistemas neurotransmissores envolvidos na regulação do humor, espera-se contribuir para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos dos transtornos mentais e para a exploração de novas abordagens terapêuticas (Mocelin *et al.*, 2015; Mocelin *et al.*, 2019). Dessa forma, os achados deste estudo podem fornecer evidências que sustentem o uso da NAC como estratégia promissora para o tratamento da depressão e da ansiedade, ampliando o conhecimento sobre seu potencial neuroprotetor e antioxidante.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. PROJETO DE PESQUISA

2.1.1. Tema

Análise bioquímica dos efeitos neuroprotetores da N-acetilcisteína (NAC) em um modelo de estresse crônico imprevisível (ECI) em peixes-zebra.

2.1.2. Problemas

Quais alterações bioquímicas o protocolo de Estresse Crônico Imprevisível (ECI) provoca em peixes-zebra?

A N-acetilcisteína (NAC) pode ser considerada um agente neuroprotetor promissor frente aos efeitos induzidos pelo protocolo de ECI?

2.1.3. Hipóteses

O protocolo de ECI induz um desequilíbrio do sistema redox cerebral, promovendo alterações bioquímicas (estresse oxidativo) em peixes-zebra.

A N-acetilcisteína é um potencial neuroprotetor por restaurar as alterações bioquímicas, como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), tióis proteicos e não proteicos (SH e NPSH, respectivamente), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferase (GST), em peixes-zebra submetidos ao ECI.

2.1.4. Objetivos

2.1.4.1. Objetivo geral

Investigar os efeitos neuroprotetores da N-acetilcisteína (NAC), com ênfase em parâmetros bioquímicos, em um modelo de ECI em peixes-zebra.

2.1.4.2. Objetivos específicos

Avaliar o impacto do protocolo de ECI nos marcadores bioquímicos de estresse oxidativo em peixes-zebra (TBARS, SH, NPSH, SOD, CAT, GPx, GST).

Investigar o efeito da N-acetilcisteína na modulação dos marcadores antioxidantes em peixes-zebra submetidos ao protocolo de ECI.

2.1.5 Justificativa

Os transtornos neuropsiquiátricos, em especial os transtornos de ansiedade e depressão, constituem um dos maiores desafios de saúde pública contemporâneos (Alvi *et al.*, 2022). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 264 milhões de pessoas em todo o mundo são afetadas por transtornos de ansiedade, enquanto a depressão atinge cerca de 280 milhões de indivíduos globalmente (*World Health Organization*, 2017). Esses transtornos, além de sua elevada prevalência, acarretam impacto substancial na qualidade de vida dos indivíduos, com repercussões sociais (Patel *et al.*, 2018). O comprometimento funcional decorrente de tais condições também se traduz em custos elevados para os sistemas de saúde e para a sociedade, estimando-se que, no contexto global, em 2010, os transtornos mentais geraram perdas superiores a US\$ 2,5 trilhões, com projeção de um aumento acentuado para US\$ 6,5 trilhões até 2030. (Insel *et al.*, 2013; Walker *et al.*, 2015).

Entre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesses transtornos, o estresse oxidativo destaca-se como um dos principais fatores subjacentes à disfunção neuronal e à neuroinflamação observadas em diversas condições psiquiátricas (Bradlow *et al.*, 2022; Tardiolo *et al.*, 2018). O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade do organismo de neutralizá-las por meio de seus mecanismos antioxidantes, levando à lesão de macromoléculas essenciais, como lipídios, proteínas e DNA, com repercussões significativas na função cerebral (Mocelin *et al.*, 2019). Este fenômeno tem sido consistentemente associado a uma série de transtornos psiquiátricos, incluindo a ansiedade, dado que o excesso de EROs pode prejudicar a homeostase do sistema nervoso central (SNC) e induzir disfunção do sistema glutamatérgico, crucial para a regulação das emoções e do comportamento (Dean *et al.*, 2011; Sha *et al.*, 2023).

A N-acetilcisteína (NAC), um derivado da cisteína com potente atividade antioxidante, tem-se destacado como uma alternativa terapêutica potencial para o tratamento de transtornos neuropsiquiátricos (Berk *et al.*, 2013; Deepmala *et al.*, 2015). Sua principal ação é restaurar os níveis de glutatona no SNC, o que auxilia na proteção contra danos causados pelo estresse oxidativo (Pedre *et al.*, 2021). Além disso, a NAC modula a sinalização do glutamato por meio do sistema Xc-, o que contribui para a regulação da liberação de cistina e de glutamato, restaurando o equilíbrio neuroquímico frequentemente alterado em condições como a ansiedade (Raghu *et al.*, 2021; Minarini *et al.*, 2017). Esse efeito é particularmente relevante no tratamento da ansiedade, pois o desequilíbrio glutamatérgico está amplamente implicado na patogênese desses transtornos (Niswender e Conn, 2010).

A utilização de modelos experimentais, como os peixes-zebra, tem-se tornado cada vez mais popular na pesquisa neuropsiquiátrica devido à sua semelhança neuroanatômica e fisiológica com a dos mamíferos (Kalueff *et al.*, 2014; Reis *et al.*, 2020). O modelo de Estresse Crônico Imprevisível (ECI), que simula as condições adversas de estresse crônico experimentadas por seres humanos com transtornos psiquiátricos, tem sido amplamente utilizado para investigar os efeitos de substâncias terapêuticas, incluindo a NAC, na modulação do estresse oxidativo e do sistema glutamatérgico (Mocelin *et al.*, 2019; Piatto *et al.*, 2011). Este modelo experimental é particularmente útil para o estudo dos mecanismos moleculares subjacentes ao comportamento ansioso e para a avaliação do potencial terapêutico de novas substâncias (Gallas-Lopes *et al.*, 2023).

Diante do exposto, o presente estudo propõe-se a investigar o efeito neuroprotetor da N-acetilcisteína em peixes-zebra submetidos ao protocolo de ECI, com foco na modulação do estresse oxidativo e na regulação do sistema glutamatérgico. O modelo de peixes-zebra permitirá a análise de alterações bioquímicas, com o objetivo de elucidar o impacto da NAC na mitigação do estresse oxidativo e da disfunção glutamatérgica, ampliando o entendimento de seus potenciais benefícios terapêuticos no tratamento de transtornos de ansiedade e de condições relacionadas (Mocelin *et al.*, 2015; Mocelin *et al.*, 2018).

2.1.6 Referencial Teórico

2.1.6.1 N-Acetilcisteína

A N-acetilcisteína (NAC) é um derivado da cisteína, amplamente utilizado como potente agente antioxidante, com aplicação terapêutica bem estabelecida no tratamento de intoxicações por paracetamol (Minarini *et al.*, 2017). Seu principal mecanismo de ação é a reposição de glutathione, um dos antioxidantes endógenos mais importantes, que atua na neutralização de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Dean *et al.*, 2011; Pedre *et al.*, 2021). Além disso, a NAC possui a capacidade de agir diretamente como um *scavenger* de radicais livres, protegendo as células do estresse oxidativo, fator-chave no desenvolvimento de várias doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, como Alzheimer, Parkinson e esquizofrenia (Berk *et al.*, 2013; Tardiolo *et al.*, 2018).

O estresse oxidativo é um dos principais mecanismos envolvidos na neurodegeneração, caracterizado pelo acúmulo excessivo de radicais livres, que causam danos a lipídios, proteínas e DNA, comprometendo a função celular (Mocelin *et al.*, 2019). A NAC, ao aumentar a disponibilidade de glutathione, ajuda a reduzir esses danos e a restaurar o equilíbrio redox. Estudos demonstram que a suplementação com NAC pode reduzir a peroxidação lipídica (TBARS), melhorar a atividade das enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), e, assim, proteger o sistema nervoso central contra danos causados pelo estresse oxidativo crônico (Raghu *et al.*, 2021; Turkmen *et al.*, 2019).

Além de suas aplicações no tratamento de intoxicações, a NAC tem sido amplamente estudada em diversos transtornos neuropsiquiátricos (Deepmala *et al.*, 2015). Ela tem demonstrado potencial significativo na modulação da inflamação neuronal e na melhora dos sintomas de condições como esquizofrenia, transtorno obsessivo-compulsivo (TOC) e

depressão, com resultados promissores na restauração da função cognitiva e na redução dos sintomas emocionais (Bradlow *et al.*, 2022). Esses efeitos neuroprotetores tornam a NAC uma substância de grande interesse para o tratamento de doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, nas quais o estresse oxidativo e a disfunção do sistema antioxidante são fatores centrais.

2.1.6.2 Peixe-zebra

O peixe-zebra (*Danio rerio*) tem se consolidado como um modelo experimental amplamente utilizado na pesquisa biomédica, incluindo estudos de neurociência e de neurotoxicologia. Sua popularidade se deve a diversas vantagens, como o pequeno tamanho, o baixo custo de manutenção, o curto ciclo de vida e a alta taxa reprodutiva. Além disso, apresenta um elevado grau de conservação genética e fisiológica em relação aos mamíferos, o que permite extrapolar diversos achados para outros organismos, inclusive humanos.

Do ponto de vista neurobiológico, o sistema nervoso central do peixe-zebra compartilha muitas características com o cérebro de vertebrados superiores, incluindo neurotransmissores, vias de sinalização e organização estrutural básica. Estudos demonstram que o peixe-zebra apresenta comportamentos complexos, como ansiedade, aprendizagem, memória e resposta ao estresse, tornando-se um modelo sensível para avaliar alterações neurocomportamentais induzidas por fármacos ou por condições ambientais adversas.

Além disso, sua resposta rápida ao estresse oxidativo e a facilidade de manipulação genética tornam o peixe-zebra um modelo ideal para investigar os mecanismos neurobiológicos subjacentes ao estresse crônico, à neurodegeneração e à ação de agentes neuroprotetores, como a NAC.

Portanto, o peixe-zebra representa uma ferramenta poderosa na investigação dos efeitos comportamentais e bioquímicos de substâncias com potencial terapêutico, permitindo uma análise integrada dos sistemas nervoso, endócrino e oxidativo em modelos de estresse ou de lesão cerebral.

2.1.6.3 Biomarcadores de Estresse Oxidativo

A avaliação bioquímica do estresse oxidativo constitui uma ferramenta essencial para a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à neurodegeneração e à ação de agentes neuroprotetores. No presente estudo, serão quantificados diversos biomarcadores que

refletem o comprometimento oxidativo em nível celular, abrangendo tanto os danos às biomoléculas quanto a atividade dos sistemas antioxidantes endógenos.

A peroxidação lipídica será estimada por meio do método dos TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), que mensura a formação de malondialdeído (MDA), um subproduto altamente reativo resultante da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares. Esse parâmetro é amplamente utilizado como marcador de dano oxidativo à estrutura lipídica, sendo frequentemente elevado em modelos de estresse crônico e em doenças neurodegenerativas.

Para a análise do comprometimento proteico, serão quantificados os grupamentos tiólicos totais (SH) e os não proteicos (NPSH), que representam, respectivamente, a integridade funcional das proteínas celulares e os níveis de glutathiona reduzida (GSH). A diminuição desses grupamentos está associada à oxidação de resíduos de cisteína e à depleção de glutathiona, o que reflete um ambiente celular pró-oxidante e prejudicial à homeostase redox.

Além disso, serão mensuradas as atividades das principais enzimas antioxidantes, responsáveis pela neutralização de espécies reativas de oxigênio (EROs). A superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, que é posteriormente convertido em água e oxigênio pela ação da catalase (CAT) e da glutathiona peroxidase (GPx). A glutathiona S-transferase (GST), por sua vez, participa da detoxificação de produtos reativos ao promover sua conjugação com glutathiona, atuando na proteção celular contra xenobióticos e produtos de peroxidação.

Esses biomarcadores, quando analisados de forma integrada, fornecem um panorama abrangente do estado redox cerebral e permitem inferir com maior precisão os efeitos moduladores da N-acetilcisteína sobre o estresse oxidativo induzido pelo protocolo de estresse crônico imprevisível (ECI). A escolha desses parâmetros baseia-se em sua robustez metodológica, sensibilidade à intervenção farmacológica e relevância em estudos pré-clínicos com modelos animais.

2.1.6.4 Transtornos Mentais

A ansiedade é um dos transtornos mentais mais prevalentes na população mundial e está frequentemente associada a um estado persistente de ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), aumento da liberação de cortisol, disfunção mitocondrial e elevação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SHA *et al.*, 2023). Esse

conjunto de alterações favorece o estabelecimento de um ambiente neurotóxico, caracterizado por inflamação crônica de baixo grau, danos ao DNA, lipoperoxidação e disfunção de neurotransmissores, especialmente do sistema glutamatérgico. Estudos com modelos animais, incluindo o peixe-zebra, mostram que a N-acetilcisteína (NAC) possui efeito ansiolítico significativo, atenuando comportamentos de evitação e hiperlocomoção, provavelmente por restaurar o equilíbrio redox e modular a transmissão glutamatérgica por meio da regulação do transportador xCT e da ativação dos receptores mGluR2/3 (Mocelin *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2014; Niswender e Conn, 2010).

No transtorno depressivo maior, os mesmos mecanismos descritos anteriormente também estão presentes, frequentemente de forma mais intensa e crônica. A depressão tem sido associada à redução dos níveis de glutathione (GSH), ao aumento de citocinas inflamatórias (como IL-6 e TNF- α) e à disfunção da neurogênese hipocampal. A NAC, ao atuar como precursora da GSH, favorece a neutralização das EROs, melhora a plasticidade sináptica e reduz a inflamação neurogênica, efeitos comprovados em estudos pré-clínicos e clínicos (Deepmala *et al.*, 2015). Ensaios randomizados demonstram que a suplementação com NAC promove redução significativa dos sintomas depressivos quando utilizada como adjuvante ao tratamento convencional, com melhora do humor e da cognição.

Além da ansiedade e da depressão, a NAC tem sido amplamente estudada em outros transtornos psiquiátricos. Em pacientes com esquizofrenia, demonstrou redução dos sintomas negativos (como embotamento afetivo e isolamento social) e melhora da cognição, possivelmente devido à sua ação antioxidante e à regulação do sistema glutamatérgico. Em casos de transtorno bipolar, a NAC tem apresentado efeitos estabilizadores do humor e melhora dos episódios depressivos. No transtorno obsessivo-compulsivo (TOC), a modulação glutamatérgica promovida pela NAC pode ajudar a reduzir comportamentos repetitivos e a rigidez cognitiva. Também tem sido investigada, com resultados promissores, em transtornos por uso de substâncias, como nicotina e cocaína, atuando na prevenção de recaídas ao restaurar o controle sobre os circuitos de recompensa e de *craving*.

Portanto, a NAC configura-se como uma molécula de interesse terapêutico crescente, especialmente por seu perfil de segurança, baixo custo e capacidade de atuar em múltiplos mecanismos neurobiológicos subjacentes a uma ampla gama de transtornos mentais associados ao estresse oxidativo e à disfunção do sistema antioxidante.

2.1.7 Metodologia

2.1.7.1 Tipo de estudo

Este trabalho consiste em uma investigação experimental, com delineamento quantitativo, controlado, randomizado e cego, de natureza analítica. O foco principal recai sobre a análise do comportamento e do estado oxidativo em modelo animal, permitindo a correlação entre variáveis bioquímicas sob diferentes condições experimentais.

2.1.7.2 Local e período

O estudo será desenvolvido nas dependências do Laboratório de Neuropsicobiologia Translacional (LaNT), da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), no *campus* de Passo Fundo, no Rio Grande do Sul. A realização do experimento está prevista para o período de agosto de 2025 a julho de 2026.

2.1.7.3 População e amostragem

A fim de representar com maior fidelidade a variabilidade genética da espécie, serão utilizados peixes-zebra (*Danio rerio*) adultos, com aproximadamente quatro meses de idade, pertencentes à linhagem *wild-type* (fenótipo *short-fin*). Os espécimes serão adquiridos de fornecedores certificados, garantindo a rastreabilidade e a qualidade dos animais. Antes do início dos procedimentos experimentais, os peixes passarão por um período de quarentena de 30 dias, durante o qual serão mantidos em sistema de recirculação de água com controle rigoroso das condições ambientais. Serão seguidos os parâmetros físico-químicos recomendados para aclimação e alimentação, conforme descritos em estudos anteriores (Mocelin *et al.*, 2019).

O cálculo do tamanho amostral foi realizado com base no desfecho primário de cada modelo experimental e nos dados disponíveis na literatura científica. Utilizou-se o software MiniTab® para a estimativa, adotando-se os seguintes parâmetros: nível de significância (α) de 5%, poder estatístico de 80%, diferença média esperada de 50% e desvio padrão estimado de 40%. Esse planejamento resultou em uma amostra total de 300 animais. Para os testes comportamentais, determinou-se que 24 animais ($n=24$) são suficientes, enquanto, para as

análises de estresse oxidativo, o número mínimo necessário é de 4 amostras (n=4), cada uma composta por um *pool* de 6 encéfalos.

2.1.7.4 Variáveis e coleta de dados

Nesta etapa, serão considerados variáveis independentes os fatores tratamento farmacológico e exposição ao ECI (anexos A a D), enquanto as variáveis dependentes consistirão nos marcadores bioquímicos de dano oxidativo e na atividade enzimática antioxidante. O sexo dos animais (machos e fêmeas) e o efeito do tanque também serão considerados, com o objetivo de controlar potenciais fatores de confusão. Para esse fim, serão utilizados, no mínimo, dois tanques por grupo experimental.

A quantificação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST), bem como dos níveis de glutathione reduzida (GSH), será realizada conforme protocolo padronizado descrito no Anexo A. As análises consistem na determinação espectrofotométrica da atividade enzimática em homogenatos encefálicos, utilizando substratos específicos e realizando a leitura em diferentes comprimentos de onda. Esses parâmetros refletem a capacidade antioxidante endógena e a eficiência dos mecanismos de defesa celular frente ao estresse oxidativo.

A atividade da enzima glutathione redutase (GR) será avaliada de acordo com o método descrito no Anexo B, baseado na taxa de oxidação do NADPH a NADP^+ em meio contendo glutathione oxidada (GSSG). A leitura espectrofotométrica será realizada a 340 nm, permitindo quantificar a capacidade do sistema antioxidante de regenerar glutathione reduzida (GSH) e, consequentemente, manter o equilíbrio redox intracelular.

A mensuração da atividade da glutathione peroxidase (GPx) seguirá o procedimento descrito no Anexo C, no qual a enzima catalisa a redução de peróxidos utilizando GSH como substrato redutor. A atividade será quantificada indiretamente pela taxa de oxidação do NADPH em um sistema acoplado à glutathione redutase, com leitura a 340 nm. Este parâmetro indica a eficiência da neutralização de peróxidos e a integridade do sistema enzimático antioxidante.

O dano oxidativo será avaliado conforme metodologia descrita no Anexo D, por meio da quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e dos grupamentos tióis proteicos (SH) e não proteicos (NPSH). Os níveis de TBARS refletem a intensidade da peroxidação lipídica, enquanto os grupamentos tióis indicam a integridade das proteínas e o estado redox intracelular. As determinações serão realizadas por meio de leitura

espectrofotométrica, permitindo a análise integrada do grau de estresse oxidativo no tecido neural.

A randomização dos tratamentos será realizada por meio de números gerados aleatoriamente (www.random.org), assegurando a distribuição equitativa dos animais entre os grupos experimentais. A codificação dos aquários será realizada por um pesquisador independente, garantindo o cegamento dos experimentadores responsáveis pela manipulação dos animais e pela execução das análises bioquímicas. Os códigos dos grupos experimentais serão revelados apenas após a conclusão das análises estatísticas.

Serão utilizados peixes-zebra adultos (cerca de 4 meses de idade), linhagem *wild-type* (fenótipo *short-fin*), adquiridos de fornecedores especializados. Os animais permanecerão em quarentena por 30 dias em sistema fechado de circulação de água, com monitoramento rigoroso dos parâmetros físico-químicos (temperatura, pH, condutividade, oxigenação e fotoperíodo de 14:10 h claro/escuro), conforme descrito na literatura (Mocelin *et al.*, 2019).

Após o período de quarentena, os animais serão alocados aleatoriamente em tanques de 16 litros (n = 12 por tanque, com proporção sexual 1:1), mantidos por 5 dias de aclimação antes da intervenção experimental. Os grupos experimentais serão organizados da seguinte forma: grupo controle (CTRL), grupo controle submetido ao ECI (CTRL+), NAC (NAC), NAC + ECI (NAC+), cetamina (KET), cetamina + ECI (KET+), fluoxetina (FLU) e fluoxetina + ECI (FLU+).

Durante os primeiros sete dias, os grupos alocados ao ECI serão expostos duas vezes ao dia a estímulos estressores aplicados de forma randomizada: perseguição com rede (8 min), confinamento em béquer (50 min), redução do volume de água (2 min), variação de temperatura para 23 °C ou 33 °C (30 min cada) e trocas consecutivas de tanque (3 trocas em 30 min). Para evitar estresse visual e interferências ambientais, serão dispostos anteparos opacos entre os tanques (30 x 60 cm), conforme os protocolos anteriores (Mocelin *et al.*, 2019).

No oitavo dia, os animais serão submetidos aos respectivos tratamentos farmacológicos: NAC (10 mg/L, 20 min), cetamina (20 mg/L, 20 min) ou fluoxetina (10 mg/L, 20 min). Água será utilizada como veículo. As dosagens e os tempos de exposição foram definidos com base em dados da literatura.

No nono dia, imediatamente após a última intervenção experimental, os peixes serão eutanasiados por resfriamento rápido (2–4 °C), conforme as diretrizes do CONCEA (2018). Os encéfalos serão rapidamente dissecados sob gelo, homogeneizados em tampão apropriado,

centrifugados (4 °C, 10.000 g, 10 min) e os sobrenadantes armazenados a –80 °C até posterior análise.

Para cada grupo experimental, serão utilizados 24 animais, divididos em quatro réplicas biológicas (n = 4), cada réplica composta por *pools* de seis encéfalos. Serão quantificados os seguintes marcadores de estresse oxidativo: a peroxidação lipídica será avaliada por meio da determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); o dano proteico será mensurado por meio da análise dos grupos tióis totais, proteicos (SH) e não proteicos (NPSH); e a atividade antioxidante enzimática será avaliada por meio da quantificação das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferase (GST).

Todos os ensaios seguirão metodologias previamente validadas (Mocelin *et al.*, 2019), com o uso de *kits* comerciais como ferramenta.

Após o término da fase experimental, os resíduos biológicos serão descartados como material contaminado e destinados de forma apropriada por empresa terceirizada vinculada à Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Passo Fundo, conforme as regulamentações institucionais de biossegurança.

2.1.7.5 Análise estatística

Para o tratamento e a interpretação dos dados obtidos, será realizada inicialmente uma análise estatística descritiva, com a construção de gráficos de frequência para a inspeção visual da distribuição das variáveis. A verificação da normalidade será realizada por meio do teste de *Shapiro-Wilk*. Com base na distribuição dos dados, serão aplicados testes paramétricos ou não paramétricos, conforme apropriado. Quando os dados apresentarem distribuição normal, será utilizada a análise de variância (ANOVA) unifatorial ou bifatorial, conforme o delineamento experimental, seguida do teste de comparações múltiplas de *Tukey* como procedimento post hoc. As análises estatísticas serão realizadas no software GraphPad Prism®, versão 9.2.0.

O fator “sexo” será inicialmente considerado na modelagem estatística. Entretanto, caso não seja observada interação significativa entre o sexo e os demais fatores avaliados, os dados de machos e fêmeas serão agrupados para simplificar a análise. Os resultados serão expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e o nível de significância adotado em todas as comparações será de 5% ($p < 0,05$).

2.1.7.6 Ética e biossegurança

Todos os procedimentos foram delineados conforme o guia *ARRIVE* (Pierce du Sert *et al.*, 2020), seguindo os princípios dos 3Rs. Vale reiterar que a eutanásia será realizada por resfriamento rápido (2–4 °C), conforme as diretrizes do CONCEA (2018). O projeto será conduzido após aprovação pela CEUA institucional (anexos E e F).

2.1.8 Recursos

Quadro 01 - Recursos

Descrição	Valor (R\$)
Materiais (laboratório)	10.000,00
Computador	5.000,00
TOTAL	15.000,00

Fonte: Autoria própria.

2.1.9 Cronograma

Quadro 02 - Cronograma

Atividades/ Período	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Ago 25	Set 25	Out 25	Nov 25	Dez 25	Jan 26	Fev 26	Mar 26	Abr 26	Mai 26	Jun 26	Jul 26
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	

Fonte: Autoria própria.

2.1.10 Referências

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.

BERK, Michael *et al.* The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 3, p. 167-177, mar. 2013.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

MOCELIN, Ricieri *et al.* N-Acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 139, p. 1-22, dez. 2015.

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.

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.

PATEL, V. *et al.* The Lancet Commission on global mental health and sustainable development. **Lancet**, v. 392, n. 10157, p. 1553–1598, out. 2018.

PEDRE, Brandán *et al.* The mechanism of action of N-acetylcysteine (NAC): The emerging role of *H₂S* and sulfane sulfur species. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 228, p. 1-22, dez. 2021.

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.

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.

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.

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.

SHA, Zhongwei *et al.* Regulatory Molecules of Synaptic Plasticity in Anxiety Disorders. **International Journal of General Medicine**, v. 16, p. 2877-2886, jul. 2023.

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.

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.

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, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Depression and other common mental disorders: global health estimates. Geneva: **WHO**, 2017.

ANEXO A – PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO ATRAVÉS DA QUANTIFICAÇÃO DAS ENZIMAS SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD), CATALASE (CAT), GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST), GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

OPEN ACCESS

protocols.io



Sep 08, 2020

Protein quantification protocol optimized for zebrafish brain tissue (Bradford method)

Adrieli Sachett¹, Matheus Gallas-Lopes¹, Greicy M M Conterato², Radharani Benvenutti¹, Ana P Herrmann¹, Angelo Piato¹

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ²Universidade Federal de Santa Catarina

1 Works for me

Share

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjnfkmbn

Fish behavior and physiology



Angelo Piato
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

ABSTRACT

Zebrafish are increasingly used as a model animal in neuroscience research. Here we describe a protocol to quantify the total amount of proteins in zebrafish brain tissue.

DOI

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjnfkmbn

PROTOCOL CITATION

Adrieli Sachett, Matheus Gallas-Lopes, Greicy M M Conterato, Radharani Benvenutti, Ana P Herrmann, Angelo Piato 2020. Protein quantification protocol optimized for zebrafish brain tissue (Bradford method). **protocols.io**
<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjnfkmbn>

KEYWORDS

Protein quantification, Zebrafish brain tissue

LICENSE

This is an open access protocol distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

CREATED

Aug 12, 2020

LAST MODIFIED

Sep 08, 2020

OWNERSHIP HISTORY

Aug 12, 2020  Matheus Gallas-Lopes Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Sep 08, 2020  Angelo Piato Universidade Federal do Rio Grande do Sul

PROTOCOL INTEGER ID

40359

protocols.io

1

09/08/2020

Citation: Adrieli Sachett, Matheus Gallas-Lopes, Greicy M M Conterato, Radharani Benvenutti, Ana P Herrmann, Angelo Piato (09/08/2020). Protein quantification protocol optimized for zebrafish brain tissue (Bradford method). <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjnfkmbn>

This is an open access protocol distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

PARENT PROTOCOLS

Cited in

Quantification of nonprotein sulfhydryl groups (NPSH) optimized for zebrafish brain tissue
Quantification of nonprotein sulfhydryl groups (NPSH) optimized for zebrafish brain tissue
Quantification of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) optimized for zebrafish brain tissue
Quantification of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) optimized for zebrafish brain tissue
Quantification of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) optimized for zebrafish brain tissue
Glutathione peroxidase (GPx) activity assessment for zebrafish brain tissue
Glutathione reductase (GR) activity assessment for zebrafish brain tissue
Glutathione peroxidase (GPx) activity assessment for zebrafish brain tissue
Glutathione reductase (GR) activity assessment for zebrafish brain tissue

GUIDELINES

This protocol is intended to standardize protein quantification of zebrafish brain tissue samples. It can be adapted for other fish species.

MATERIALS TEXT

MATERIALS

-  **Gloves** **Contributed by users**
-  **96 well plate** **Contributed by users**
-  **Surgical mask** **Contributed by users**
-  **Micropipette (0.5 - 10 µL)** **Contributed by users**
-  **Micropipette (100 - 1000 µL)** **Contributed by users**
-  **13x045 mm needles** **Contributed by users**
-  **Multichannel pipette (5 µL; 30-300 µL)** **Contributed by users**
-  **Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader** **Biotek**

STEP MATERIALS

-  **Bovine albumin fraction**
- V INLAB Catalog #1870** Step 1.2
-  **ortho-Phosphoric acid 85%** **Sigma-**
aldrich Catalog #1005732500 Step 1.1
-  **Brilliant Blue G** **Sigma-**
aldrich Catalog #27815 Step 1.1
-  **Ethanol** **Merck**
Millipore Catalog #100983 Step 1.1
-  **Phosphate buffered saline powder, pH 7.4, for preparing 1 L solutions** **Millipore**
Sigma Catalog #P3813 Step 1.3

SAFETY WARNINGS

Use personal protective equipment (including lab coat, masks, and gloves) when manipulating chemical and biological samples. Read the Safety Data Sheets of the reagents.

BEFORE STARTING

This protocol was standardized at LAPCOM (Psychopharmacology and Behavior Laboratory at UFRGS) to assess biochemical parameters in zebrafish brain tissue. Protocols you should read before proceeding with this method:

Adrieli Sachett, Matheus Gallas-Lopes, Radharani Benvenuti, Greicy M M Conterato, Ana Herrmann, Angelo Piato. How to prepare zebrafish brain tissue samples for biochemical assays.
<https://protocols.io/view/how-to-prepare-zebrafish-brain-tissue-samples-for-bjkdks6>

Preparing the reagents

- 1 The first step is to prepare the reagents to be used in protein quantification;

1.1

Bradford reagent: Prepare and use this reagent under dim or no light, making sure all glassware used is covered in aluminum foil to avoid photodegradation of the reagent. Prepare and use this reagent at room temperature;

- 1.1.1 Weigh **0.05 g** of Coomassie Brilliant Blue;

 **Brilliant Blue G Sigma-**

aldrich Catalog #27815

- 1.1.2 Dissolve completely the Coomassie Brilliant Blue in **25 mL** of absolute ethanol in a beaker of appropriate size;

 **Ethanol Merck**

Millipore Catalog #100983

- 1.1.3 Add **50 mL** of 85% orthophosphoric acid to the solution;

 **ortho-Phosphoric acid 85% Sigma-**

aldrich Catalog #1005732500

- 1.1.4 Transfer your solution to a **500 mL** volumetric flask;

- 1.1.5 Using ultrapure water, complete the solution's volume to reach **500 mL** ;

- 1.1.6 Store the solution in a glass flask covered in aluminum foil;

- 1.2 **Albumin solution:** The dilution of this solution depends on the concentration needed to build your standard curve (in this case **10 mg/mL**);

Preparing a stock solution of 10 mg/mL :

- 1.2.1 Weigh **0.1 g** of bovine albumin;

 **Bovine albumin fraction**

V INLAB Catalog #1870

- 1.2.2 Dissolve completely the albumin powder in **9 mL** of ultrapure water using a beaker of appropriate size;

- 1.2.3 Transfer your solution to a **10 mL** volumetric flask;

- 1.2.4 Using ultrapure water, complete the solution's volume to reach **10 mL** ;

- 1.2.5 Stock this solution at **-20 °C** , in samples of **1.5 mL** or **2 mL** using plastic microtubes;

1.2.5 Unfreeze one of those (M)10 mg/mL samples and dilute it to the concentration needed ((M)1 mg/mL) following the calculation below:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$
$$(M)10 \text{ mg/mL} \times V1 = (M)1.0 \text{ mg/mL} \times 10 \text{ mL}$$
$$V1 = 1 \text{ mL of the stock solution (1000 } \mu\text{L)}$$

1.2.6 Using a micropipette, collect 1000 μL of the stock solution and transfer it to a 10 mL volumetric flask;

1.2.7 Using ultrapure water, complete the solution's volume to reach 10 mL ;

1.3 **Phosphate buffered saline solution (PBS):** You should also prepare a PBS solution (pH7.4) as you will need 10 μL of the solution at room temperature to determine the control point of the standard curve.

☒ Phosphate buffered saline powder, pH 7.4, for preparing 1 L solutions **Millipore**
Sigma Catalog #P3813

Microplate preparation and protein quantification

2   

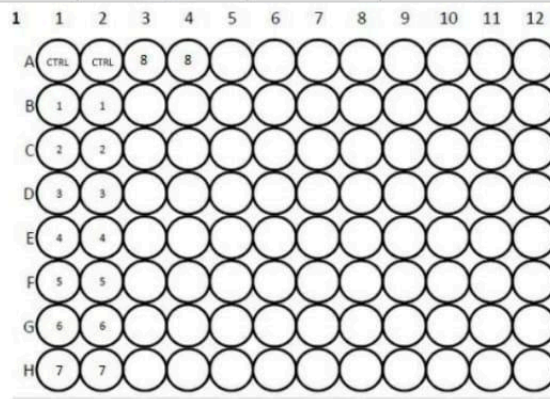
Use a conventional 96-well microplate to run your samples. Once again, protein quantification using Bradford reagent should be performed under dim or no light, making sure the microplate is carefully covered in aluminum foil to avoid photodegradation of the reagent. Also, this step should occur at room temperature;

2.1 Before start pipetting, each well of the microplate should be marked for sample identification.
Absorbance should be read no later than ⌚ 01:00:00 after pipetting tissue samples;

2.2 Use one of the microtubes with the bovine albumin solution to generate the standard curve to quantify the proteins in your tissue ➡ go to step #1.2 ;

2.3 To generate the standard curve, fill the wells of your microplate as described below. You should provide duplicates or triplicates of each point of the curve to make your quantification more precise. Using a micropipette fill the wells in this order: Bradford reagent, Phosphate buffered saline solution (PBS), and bovine albumin solution (mixing the solution with the pipette tip to homogenize the content of each well). Air bubbles should be perforated with a needle to avoid bias in the analysis;

Well/Point of the curve	Bradford reagent	PBS	Bovine albumin (1 mg/mL)
Control	190 μ L	10 μ L	-
1	198 μ L	-	2 μ L
2	196 μ L	-	4 μ L
3	194 μ L	-	6 μ L
4	192 μ L	-	8 μ L
5	190 μ L	-	10 μ L
6	188 μ L	-	12 μ L
7	186 μ L	-	14 μ L
8	184 μ L	-	16 μ L



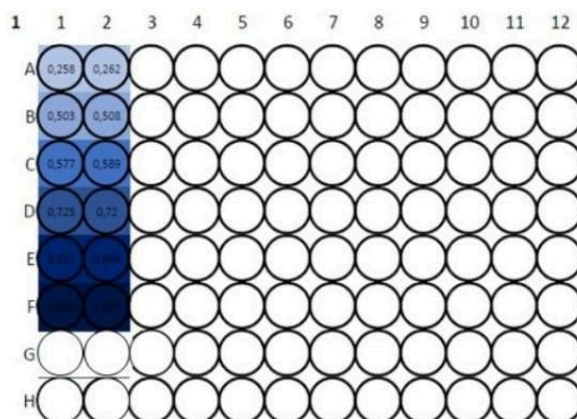
Example of the configuration of the plate to determine the standard curve. CTRL: control.

2.4 Read the absorbance of at **595 nm** in a microplate reader;

2.5 A demonstration of the expected results for the absorbances of the samples composing the curve is shown below. Calculate the mean absorbance to use in the further quantification of brain protein content;

Well/Point of the curve	Absorbance 1	Absorbance 2	Mean
Control	0.262	0.258	0.260
1	0.503	0.511	0.507
2	0.577	0.589	0.583
3	0.725	0.720	0.723
4	0.852	0.897	0.875
5	0.876	0.904	0.890

Use duplicates or triplicates of each point to assure that your quantification is precise.

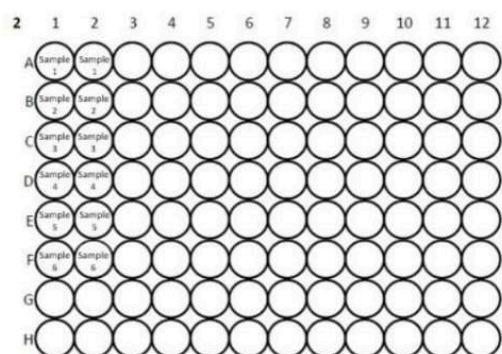


Example of the expected result in the plate. Different blue shades of blue are a result of the different quantities of protein present in each of the wells.

- 2.6 Following the determination of your standard curve, proceed to the quantification of your tissue samples. Using an adequate micropipette, fill the wells of your microplate as described below. You should provide triplicates or quadruplicates of each sample to make your quantification more precise. Using a micropipette fill the wells in this order: Firstly, fill the wells with the Bradford reagent followed by the tissue samples, mixing the solution with the pipette tip to homogenize the content of each well. Tissue sample collection and preparation are described elsewhere. The absorbance must be read in a maximum of 01:00:00 after pipetting the samples as stated above. Always use new tips for each sample and make sure that any researcher who handles the samples and plates is wearing a mask and gloves to avoid contamination. Air bubbles should be perforated with a needle to avoid bias in the analysis;

Adrieli Sachett, Matheus Gallas-Lopes, Radharani Benvenuti, Greicy M M Conterato, Ana Herrmann, Angelo Plato. How to prepare zebrafish brain tissue samples for biochemical assays.
<https://protocols.io/view/how-to-prepare-zebrafish-brain-tissue-samples-for-bjkdks6>

Well/Point of the curve	Bradford reagent	Tissue sample
Sample 1	190 µL	10 µL
Sample 2	190 µL	10 µL
Sample 3	190 µL	10 µL
Sample (n)	190 µL	10 µL



Example of the configuration of the plate to quantify the protein content of your sample.

2.7 Read the absorbance of the samples at **595 nm** in a microplate reader;

2.8 A demonstration of the expected results for the absorbances of the tissue samples is shown below;

Well/Point of the curve	Abs 1	Abs 2	Abs3	Abs 4	Mean	Corrected mean absorbance of the sample
Sample 1	1.100	1.038	1.111	1.056	-	-
Sample 2	1.128	1.060	1.037	1.057	-	-
Sample 3	0.787	0.784	0.737	0.824	0.769	0.509
Sample 4	0.945	0.841	0.876	0.851	0.856	0.596
Sample 5	1.009	0.969	1.001	0.950	0.960	0.700
Sample 6	0.727	1.087	1.027	0.464	-	-
Sample 7	1.148	1.140	1.119	1.139	-	-
Sample 8	1.029	1.016	0.956	1.026	-	-
Sample 9	1.068	1.000	0.991	0.991	0.991	0.731
Sample 10	0.444	0.814	0.885	0.891	0.888	0.628
Sample 11	1.104	1.055	1.027	1.019	-	-
Sample 12	1.210	1.218	1.196	1.188	-	-
Sample 13	1.167	0.763	0.839	0.829	0.834	0.574
Sample 14	0.842	0.726	0.740	0.750	0.739	0.479

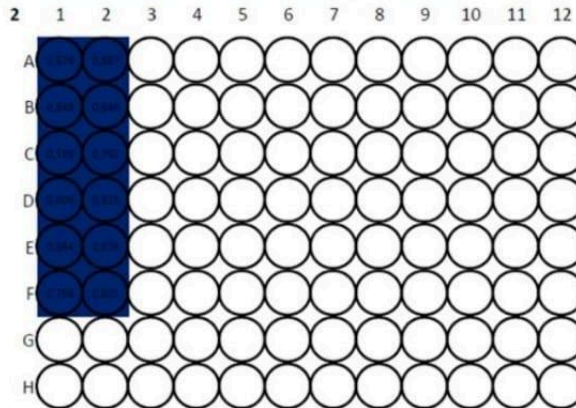
What to look for when revising your data:

The corrected mean absorbance of the sample is calculated by: Mean absorbance - Mean absorbance of the control sample of the curve.

Any absorbance reading above 1 (in italic) must be disregarded as the quantification won't be precise. If all of your readings are above 1, follow step 3.

When taking readings in triplicates or quadruplicates, one or two of the absorbance values can be

disregarded if they are significantly different from the others (in bold and italic) and the average can be taken from the remaining values to ensure greater homogeneity of the data.



Example of the expected result in the plate. The blue color of the solution is directly related to the amount of protein present in each of the wells.

Protein quantification: optional steps

3

If the absorbance of your samples is above 1, the samples should be diluted in the portion of 1:2 (or even 1:3, 1:(n)) and go through a new reading phase as described above → **go to step #2**, always remembering to multiply the final absorbance value obtained by the dilution factor (as shown in the calculations below).

Calculating data and determining results

4

Follow the calculations below to get your results;

4.1 Calculate the correction factor for your bovine albumin standard curve;

4.1.1 Correction factor (CF): Subtract the absorbance value of the control point of the curve from the mean absorbance of the point you are calculating. Divide the concentration of albumin of the well/point of the curve by the resulting value from the subtraction before;

$$CF = \frac{[\text{Albumin}]}{\text{Mean Abs} - \text{Control Abs}}$$

4.1.2 Mean correction factor (MCF): The mean correction factor is calculated by the arithmetic mean of the correction factors for each point of the curve;

$$MCF = \frac{\sum \text{Correction factors}}{\text{Count of correction factors}}$$

or

$$MCF = \frac{F_{C1} + F_{C2} + F_{C3} + F_{C4} + F_{C5}}{5(\text{number of factors})}$$



Using a solution of **1 mg/mL** of bovine albumin and the expected results shown above:

Well/Point of the curve	Absorbance 1	Absorbance 2	Mean
Control	0.262	0.258	0.260
1	0.503	0.511	0.507
2	0.577	0.589	0.583
3	0.725	0.720	0.723
4	0.852	0.897	0.875
5	0.876	0.904	0.890

Correction factors:

Well/point of the curve: 1

Mean absorbance of the point - Control absorbance = 0.507 - 0.260 = **0.247**

[] Albumin: 1 mg - 1000 µL
x - 2 µL x = **2 µg**

CF₁ = 2 µg / 0.247 = **8.09717 µg/nm**

Well/point of the curve: 2

Mean absorbance of the point - Control absorbance = 0.583 - 0.260 = **0.323**

[] Albumin: 1 mg - 1000 µL
x - 4 µL x = **4 µg**

CF₁ = 4 µg / 0.323 = **12.38390 µg/nm**

Well/point of the curve: 3

Mean absorbance of the point - Control absorbance = 0.723 - 0.260 = **0.463**

[] Albumin: 1 mg - 1000 µL
x - 6 µL x = **6 µg**

CF₁ = 6 µg / 0.463 = **12.95896 µg/nm**

Well/point of the curve: 4

Mean absorbance of the point - Control absorbance = 0.875 - 0.260 = **0.615**

[] Albumin: 1 mg - 1000 µL
x - 8 µL x = **8 µg**

CF₁ = 8 µg / 0.615 = **13.00813 µg/nm**

Well/point of the curve: 5

Mean absorbance of the point - Control absorbance = 0.890 - 0.260 = **0.630**

[] Albumin: 1 mg - 1000 µL
x - 10 µL x = **10 µg**

$$CF_1 = 10 \mu\text{g} / 0.630 = 15.87302 \mu\text{g/nm}$$

Mean correction factor:

$$8.09717 + 12.38390 + 12.95896 + 13.00813 + 15.87302 = 62.32118 \mu\text{g/nm}$$

$$MCF = 62.32118 / 5 = 12.464236 \mu\text{g/nm}$$

- 4.2 Calculate the amount of protein of each of your tissue samples (the results should be expressed as $\mu\text{g/mL}$ of proteins);

4.2.1 The amount of protein in your samples is calculated by multiplying the corrected mean absorbance of your sample to the mean corrected factor calculated above and dividing the result by the volume of the tissue sample used (in this case $10 \mu\text{L}$);

$$\text{Amount of protein} = \frac{(\text{Corrected mean absorbance} \times \text{MCF})}{10 \mu\text{L}}$$

P.S. remember the corrected mean absorbance of the sample is calculated by subtracting the absorbance value of the control point of the standard curve from the mean absorbance of the sample that you are calculating.

4.2.2 If you are using diluted samples, remember to multiply the final absorbance value obtained by the dilution factor (DF).

$$\text{Amount of protein} = \frac{(\text{Corrected mean absorbance} \times \text{MCF})}{10 \mu\text{L}} \times (\text{DF})$$

P.S. the dilution factor depends on the proportion of the dilution applied:

$$DF (1:2) = 2$$

$$DF (1:3) = 3$$

$$DF (1:4) = 4$$

Well/Point of the curve	Abs 1	Abs 2	Abs3	Abs 4	Mean	Corrected mean absorbance of the sample
Sample 1	1.100	1.038	1.111	1.056	-	-
Sample 2	1.128	1.060	1.037	1.057	-	-
Sample 3	0.787	0.784	0.737	0.824	0.769	0.509
Sample 4	0.945	0.841	0.876	0.851	0.856	0.596
Sample 5	1.009	0.969	1.001	0.950	0.960	0.700
Sample 6	0.727	1.087	1.027	0.464	-	-
Sample 7	1.148	1.140	1.119	1.139	-	-
Sample 8	1.029	1.016	0.956	1.026	-	-
Sample 9	1.068	1.000	0.991	0.991	0.991	0.731
Sample 10	0.444	0.814	0.885	0.891	0.888	0.628
Sample 11	1.104	1.055	1.027	1.019	-	-
Sample 12	1.210	1.218	1.196	1.188	-	-
Sample 13	1.167	0.763	0.839	0.829	0.834	0.574
Sample 14	0.842	0.726	0.740	0.750	0.739	0.479

Calculating the amount of protein in the available samples above:

Sample 3:
 $(0.509 \times 12.464236) / 10 = 0.634$ Dilution factor (1:2): $0.634 \times 2 = 1.269 \mu\text{g/mL}$ of proteins

Sample 4:
 $(0.596 \times 12.464236) / 10 = 0.743$ Dilution factor (1:2): $0.743 \times 2 = 1.486 \mu\text{g/mL}$ of proteins

Sample 5:
 $(0.700 \times 12.464236) / 10 = 0.872$ Dilution factor (1:2): $0.634 \times 2 = 1.745 \mu\text{g/mL}$ of proteins

Sample 9:
 $(0.731 \times 12.464236) / 10 = 0.911 \mu\text{g/mL}$ of proteins

Sample 10:
 $(0.628 \times 12.464236) / 10 = 0.783 \mu\text{g/mL}$ of proteins

Sample 13:
 $(0.574 \times 12.464236) / 10 = 0.715 \mu\text{g/mL}$ of proteins

Sample 14:
 $(0.479 \times 12.464236) / 10 = 0.597 \mu\text{g/mL}$ of proteins

ANEXO B – PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO ATRAVÉS DA QUANTIFICAÇÃO DA ENZIMA GLUTATIONA REDUTASE (GR)

OPEN ACCESS

protocols.io



Jun 15, 2021

Glutathione reductase (GR) activity assessment for zebrafish brain tissue

Adrieli Sachett¹, Matheus Gallas-Lopes¹, Greicy M M Conterato², Ana P Hermann¹, Angelo Piato¹

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ²Universidade Federal de Santa Catarina

1 Works for me

Share

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bsuuneww



Angelo Piato
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

ABSTRACT

Zebrafish are being increasingly used as a model animal in neuroscience research. Here we describe a protocol to assess brain tissue activity of glutathione reductase (GR), an enzyme that catalyzes the reduction of the oxidized glutathione (GSSG) to the reduced form glutathione (GSH) which has a critical role in counterbalancing oxidative damage.

DOI

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bsuuneww

PROTOCOL CITATION

Adrieli Sachett, Matheus Gallas-Lopes, Greicy M M Conterato, Ana P Hermann, Angelo Piato 2021.
Glutathione reductase (GR) activity assessment for zebrafish brain tissue. **protocols.io**
<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bsuuneww>

LICENSE

This is an open access protocol distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

CREATED

Feb 28, 2021

LAST MODIFIED

Jun 15, 2021

OWNERSHIP HISTORY

Feb 28, 2021  Matheus Gallas-Lopes Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Jun 15, 2021  Angelo Piato Universidade Federal do Rio Grande do Sul

PROTOCOL INTEGER ID

47732

GUIDELINES

This protocol is intended to standardize glutathione reductase activity assessment in zebrafish brain tissue samples. It can be adapted for other fish species.

protocols.io

1

06/15/2021

Citation: Adrieli Sachett, Matheus Gallas-Lopes, Greicy M M Conterato, Ana P Hermann, Angelo Piato (06/15/2021). Glutathione reductase (GR) activity assessment for zebrafish brain tissue. <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bsuuneww>

This is an open access protocol distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution License** (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

MATERIALS TEXT

 **Gloves** Contributed by users  **96 well plate** Contributed by users

 **1.5 mL Eppendorf tubes** Contributed by users  **Surgical mask** Contributed by users

 **Micropipette (0.5 - 10 µL)** Contributed by users  **Micropipette (100 - 1000 µL)** Contributed by users

 **pH meter** Contributed by users  **Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader** Contributed by users

 **Multichannel pipette (5 µL; 30- 300 µL)** Contributed by users  **Ultrapure water** Contributed by users

 **Monobasic potassium phosphate** **NUCLEAR Catalog #318312** Step 1.1

 **Potassium phosphate** **Neon Catalog #11361** Step 1.1

 **Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate** **Sigma Aldrich Catalog #E5134-1KG** Step 1.2

 **L-Glutathione oxidized** **Sigma Aldrich** Step 1.3

 **NADPH Tetrasodium salt** **Sigma Aldrich Catalog #10107824001** Step 1.4

SAFETY WARNINGS

Use personal protective equipment (including lab coats, masks, and gloves) when manipulating chemical and biological samples. Read the Safety Data Sheets of the reagents.

BEFORE STARTING

This protocol was standardized at LAPCOM (Psychopharmacology and Behavior Laboratory at UFRGS) to assess biochemical parameters in zebrafish brain tissue. Protocols you should read before proceeding with this method:

Adrieli Sachett, Matheus Gallas-Lopes, Radharani , Greicy M M Conterato, Ana Hermann, Angelo Piato. How to prepare zebrafish brain tissue samples for biochemical assays.
<http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjkdks6>

Adrieli Sachett, Matheus Gallas-Lopes, Greicy M M Conterato, Radharani , Ana Hermann, Angelo Piato. Protein quantification protocol optimized for zebrafish brain tissue (Bradford method).
<http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjnfkmnb>

Preparing the reagents

- 1 The first step is to prepare the reagents to be used in the assessment of glutathione reductase activity;

1.1 Potassium phosphate buffer [K]154 Milimolar (mM) :

1.1.1 Weigh **2.095 g** of monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4) in a beaker of appropriate size;

Monobasic potassium

phosphate NUCLEAR Catalog #318312

1.1.2 Dissolve the salt with **90 mL** of ultrapure water;

1.1.3 Transfer the solution to a **100 mL** volumetric flask;

1.1.4 Using ultrapure water, complete the solution's volume to reach **100 mL** ;

1.1.5 Weigh **2.682 g** of dibasic potassium phosphate (K_2HPO_4) in a beaker of appropriate size;

Potassium phosphate

dibasic Neon Catalog #11361

1.1.6 Dissolve the salt with **90 mL** of ultrapure water;

1.1.7 Transfer the solution to a **100 mL** volumetric flask;

1.1.8 Mix both solutions slowly in a **500 mL** beaker following the steps below;

- Transfer **50 mL** of the monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4) solution to the beaker;
- Use a pH sensor to evaluate your solution. Expected conditions: **pH7.0** ;

If the pH of your solution is lower than 7 adjust the pH adding drops of the dibasic potassium phosphate (K_2HPO_4) solution;

If the pH of your solution is above 7 adjust the pH adding drops of the monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4) solution;

After adjusting the pH of this initial solution, proceed to add, slowly, drops of both buffer solutions (monobasic potassium phosphate and dibasic potassium phosphate). Use Pasteur pipettes to add the solutions. Mix your solutions using a pH sensor, making sure the mix of both buffers is always at

pH7.0 ;

1.2 EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) buffer **1.54 Millimolar (mM)** + Potassium phosphate buffer:

1.2.1 Weigh **0.057 g** of EDTA;

Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate Sigma

Aldrich Catalog #E5134-1KG

1.2.2 Dissolve completely the EDTA powder in **90 mL** of the potassium phosphate buffer solution prepared in the last step using a beaker of appropriate size;

1.2.3 Transfer your solution to a **100 mL** volumetric flask;

1.2.4 Using the potassium phosphate buffer solution prepared in the last step, complete the solution's volume to reach **100 mL** ;

1.2.5 Use a pH sensor to evaluate your solution. Expected conditions: **pH7.0** ;

1.2.6 Store this solution in an amber flask at $\pm 8^{\circ}\text{C}$;

1.3 Oxidized glutathione (GSSG) [M]20 Milimolar (mM) :

1.3.1 Weigh 0.0612 g of GSSG;

 L-Glutathione oxidized **Sigma Aldrich**

1.3.2 Dissolve completely the GSSG in 5 mL of ultrapure water using a container of appropriate size;

1.3.3 Stock this solution at $\pm 20^{\circ}\text{C}$, in samples of 1 mL using plastic microtubes;

1.4 NADPH (Dihydronicotinamide adenine dinucleotide phosphate tetrasodium salt) [M]2 Milimolar (mM) :

1.4.1 Weigh 0.016 g of NADPH;

 NADPH Tetrasodium salt **Sigma**

Aldrich Catalog #10107824001

1.4.2 Dissolve completely the NADPH in 10 mL of ultrapure water using a container of appropriate size;

1.4.3 Stock this solution at $\pm 20^{\circ}\text{C}$, in samples of $500\text{ }\mu\text{L}$ using plastic microtubes;

Microplate preparation and absorbance reading

5m 5s

- 2 Use a conventional 96-well microplate to run your samples. Tissue sample collection and preparation are described elsewhere;

Adrieli Sachett, Matheus Gallas-Lopes, Radharani, Greicy M M Conterato, Ana Herrmann, Angelo Piato. How to prepare zebrafish brain tissue samples for biochemical assays.
<http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjkdks6>

- 2.1 You must calculate the sample volume that corresponds to $30\text{ }\mu\text{g}$ of proteins. This calculation is based on the Bradford method described elsewhere;

Adrieli Sachett, Matheus Gallas-Lopes, Greicy M M Conterato, Radharani, Ana Herrmann, Angelo Piato. Protein quantification protocol optimized for zebrafish brain tissue (Bradford method).
<http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjnfkmbn>

2.1.1 To estimate the volume of the sample corresponding to $30\text{ }\mu\text{g}$ of proteins, divide the amount of protein needed ($30\text{ }\mu\text{g}$) by the total amount of proteins in the sample quantified by the Bradford method (example below);

Volume of the sample needed for the assay (μL) = $30\text{ }\mu\text{g}$ / total amount of proteins in

the sample $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

- 2.2 Place and keep your Potassium phosphate buffer/EDTA [go to step #1.2](#) on a water bath at 30°C throughout the analysis;
- 2.3 Set your microplate reader to the following configuration: Kinetic mode with agitation; 340 nm ; Readings every $00:00:15$ for $00:05:00$; 30°C ;
- 2.4 Using an adequate micropipette, fill the wells of your microplate as described below. You should provide duplicates or triplicates of each sample as stated above. Using a micropipette fill the wells in this order: Tissue sample, Potassium phosphate buffer/EDTA, and NADPH. Lastly, you must add the GSSG solution **as quickly as possible** using a multichannel pipette while being careful to homogenize the content of the wells. The Potassium phosphate buffer/EDTA volume depends on the volume of the sample. All wells should have a final volume of $250\text{ }\mu\text{L}$, so the Potassium phosphate buffer/EDTA is used so that every solution reaches this volume (e.g., $50\text{ }\mu\text{L}$ of the sample + $150\text{ }\mu\text{L}$ of the Potassium phosphate buffer/EDTA + $25\text{ }\mu\text{L}$ of NADPH + $25\text{ }\mu\text{L}$ of GSSG);

A	B	C	D	E
Well	Sample (μL)	Potassium phosphate buffer/EDTA 154 mM (μL)	NADPH 2 mM (μL)	GSSG 20 mM (μL)
Control	0	200	25	25
Samples	Depends on the volume of the sample corresponding to $30\text{ }\mu\text{g}$ of proteins.	Depends on the volume of the sample. Volume needed for the final solution in the tube to reach $250\text{ }\mu\text{L}$. ($200 - \text{sample volume}$)	25	25

- 2.5 Read the absorbance of the samples at the set conditions. You should see the absorbance of the sample wells decrease throughout the $00:05:00$ of measurement;

Calculating data and determining results 8m

- 3 Choose the best $00:01:00$ interval within the $00:05:00$ of sampling. To do so check for the interval where the decrease between absorbances is the greatest;
- 3.1 Calculate the mean absorbance of the wells containing the control solution and the wells containing your samples for each reading. Take into consideration whether you chose to use duplicates or triplicates of your samples.
- 3.2 Calculate the difference between the mean absorbance of the control samples within the $00:01:00$ interval that was chosen;

$$\Delta_{\text{control}} = (\text{Mean absorbance at 0 s} - \text{Mean absorbance after 60 s})$$

- 3.3 Calculate the difference between the mean absorbance of each of your samples within the 1m
00:01:00 interval that was chosen;

$$\Delta_{\text{sample}} = (\text{Mean absorbance at 0 s} - \text{Mean absorbance at 60 s})$$

- 3.4 Subtract the Δ_{control} value from the Δ_{sample} value for each of the samples;

$$\text{Absorbance of the sample } (\Delta \text{ min}) = (\Delta_{\text{sample}} - \Delta_{\text{control}})$$

- 3.5 Determine GR activity:

$$\text{GR activity} = (\Delta \text{ min} \times \text{final volume (mL)} \times 1000000 \times 1 \text{ mg} / (6.22 \times 1000 \text{ mL} \times \text{amount of protein (mg)}))$$

$$\text{GR activity} = (\Delta \text{ min} \times 0,25 \text{ mL} \times 1000000 \times 1 \text{ mg} / (6.22 \times 1000 \text{ mL} \times 0,03 \text{ mg}))$$

$$\text{Simplifying: GR activity} = (\Delta \text{ min} \times 250000) / 186.6$$

P.S.: $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ = molar extinction coefficients of NADPH

- 3.6 Final results are expressed as nmol NADPH/min/mg of protein.

ANEXO C – PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO ATRAVÉS DA QUANTIFICAÇÃO DA ENZIMA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)



Jun 15, 2021

Glutathione peroxidase (GPx) activity assessment for zebrafish brain tissue

Adrieli Sachett¹, Matheus Gallas-Lopes¹, Greicy M M Conterato², Ana P Hermann¹, Angelo Piato¹

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ²Universidade Federal de Santa Catarina

1 Works for me

Share

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bsujneun



Angelo Piato
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

ABSTRACT

Zebrafish are being increasingly used as a model animal in neuroscience research. Here we describe a protocol to assess brain tissue activity of glutathione peroxidase (GPx), an enzyme glutathione family, and act how the main remover of hydrogen peroxide in zebrafish brain and whose main biological role is to protect the organism from oxidative damage.

DOI

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bsujneun

PROTOCOL CITATION

Adrieli Sachett, Matheus Gallas-Lopes, Greicy M M Conterato, Ana P Hermann, Angelo Piato 2021. Glutathione peroxidase (GPx) activity assessment for zebrafish brain tissue. **protocols.io** <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bsujneun>



LICENSE

This is an open access protocol distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

CREATED

Feb 27, 2021

LAST MODIFIED

Jun 15, 2021

OWNERSHIP HISTORY

Feb 27, 2021  Matheus Gallas-Lopes Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Jun 15, 2021  Angelo Piato Universidade Federal do Rio Grande do Sul

PROTOCOL INTEGER ID

47723

GUIDELINES

This protocol is intended to standardize glutathione peroxidase activity assessment in zebrafish brain tissue samples. It can be adapted for other fish species.

MATERIALS TEXT

☐ Gloves **Contributed by users** ☐ 96 well plate **Contributed by users**

☐ 1.5 mL Eppendorf tubes **Contributed by users** ☐ Surgical mask **Contributed by users**

☐ Micropipette (0.5 - 10 μ L) **Contributed by users** ☐ Micropipette (100 - 1000 μ L) **Contributed by users**

☐ pH meter **Contributed by users** ☐ Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader **Contributed by users**

☐ Multichannel pipette (5 μ L; 30- 300 μ L) **Contributed by users** ☐ Ultrapure water **Contributed by users**

☐ Monobasic potassium phosphate **NUCLEAR Catalog #318312** Step 1.1

☐ Potassium phosphate dibasic **Neon Catalog #11361** Step 1.1

☐ Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate **Sigma Aldrich Catalog #E5134-1KG** Step 1.2

☐ L-Glutathione reduced **Sigma Aldrich Catalog #G4251** Step 1.3

☐ NADPH Tetrasodium salt **Sigma Aldrich Catalog #10107824001** Step 1.4

☐ Sodium azide **Sigma Aldrich Catalog #S2002** Step 1.5

☐ Glutathione Reductase from bakers yeast (*S. cerevisiae*) **Sigma Aldrich Catalog #G3664** Step 1.6

☐ Hydrogen peroxide 35% **Neon Catalog #0 1984** Step 2

SAFETY WARNINGS

Use personal protective equipment (including lab coats, masks, and gloves) when manipulating chemical and biological samples. Read the Safety Data Sheets of the reagents.

BEFORE STARTING

This protocol was standardized at LAPCOM (Psychopharmacology and Behavior Laboratory at UFRGS) to assess biochemical parameters in zebrafish brain tissue. Protocols you should read before proceeding with this method:

Adrieli Sachett, Matheus Gallas-Lopes, Radharani , Greicy M M Conterato, Ana Hermann, Angelo Piato. How to prepare zebrafish brain tissue samples for biochemical assays.
<http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjkdks6>

Adrieli Sachett, Matheus Gallas-Lopes, Greicy M M Conterato, Radharani , Ana Hermann, Angelo Piato. Protein quantification protocol optimized for zebrafish brain tissue (Bradford method).
<http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjnfkmbn>

Preparing the reagents

- 1 The first step is to prepare the reagents to be used in the assessment of glutathione peroxidase activity;

1.1 Potassium phosphate buffer [M]0.5 Molarity (M) :

1.1.1 Weigh **6.804 g** of monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4) in a beaker of appropriate size;

Monobasic potassium

phosphate NUCLEAR Catalog #318312

1.1.2 Dissolve the salt with **90 mL** of ultrapure water;

1.1.3 Transfer the solution to a **100 mL** volumetric flask;

1.1.4 Using ultrapure water, complete the solution's volume to reach **100 mL** ;

1.1.5 Weigh **8.709 g** of dibasic potassium phosphate (K_2HPO_4) in a beaker of appropriate size;

Potassium phosphate

dibasic Neon Catalog #11361

1.1.6 Dissolve the salt with **90 mL** of ultrapure water;

1.1.7 Transfer the solution to a **100 mL** volumetric flask;

1.1.8 Mix both solutions slowly in a **500 mL** beaker following the steps below;

- Transfer **50 mL** of the monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4) solution to the beaker;

- Use a pH sensor to evaluate your solution. Expected conditions: **pH7.0** ;

If the pH of your solution is lower than 7 adjust the pH adding drops of the dibasic potassium phosphate (K_2HPO_4) solution;

If the pH of your solution is above 7 adjust the pH adding drops of the monobasic potassium phosphate (KH_2PO_4) solution;

After adjusting the pH of this initial solution, proceed to add, slowly, drops of both buffer solutions (monobasic potassium phosphate and dibasic potassium phosphate). Use Pasteur pipettes to add the solutions. Mix your solutions using a pH sensor, making sure the mix of both buffers is always at

pH7.0 ;

1.2 EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) [M]5 Milimolar (mM) + Potassium phosphate buffer:

1.2.1 Weigh **0.186 g** of EDTA;

Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate Sigma

Aldrich Catalog #E5134-1KG

1.2.2 Dissolve completely the EDTA powder in **90 mL** of the potassium phosphate buffer solution

prepared in the last step using a beaker of appropriate size;

1.2.3 Transfer your solution to a **100 mL** volumetric flask;

1.2.4 Using the potassium phosphate buffer solution prepared in the last step, complete the solution's volume to reach **100 mL** ;

1.2.5 Use a pH sensor to evaluate your solution. Expected conditions: **pH 7.0** ;

1.2.6 Store this solution in an amber flask at **8 °C** ;

1.3 Reduced glutathione (GSH) **[M]10 Milimolar (mM)** :

1.3.1 Weigh **0.0154 g** of GSH;

 **L-Glutathione reduced Sigma**

Aldrich Catalog #G4251

1.3.2 Dissolve completely the GSH in **5 mL** of ultrapure water using a container of appropriate size;

1.3.3 Stock this solution at **-20 °C** , in samples of **500 µL** using plastic microtubes;

1.4 NADPH (Dihydronicotinamide adenine dinucleotide phosphate tetrasodium salt)

[M]1.6 Milimolar (mM) :

1.4.1 Weigh **0.013 g** of NADPH;

 **NADPH Tetrasodium salt Sigma**

Aldrich Catalog #10107824001

1.4.2 Dissolve completely the NADPH in **10 mL** of ultrapure water using a container of appropriate size;

1.4.3 Stock this solution at **-20 °C** , in samples of **500 µL** using plastic microtubes;

1.5 Sodium azide (NaN₃) **[M]10 Milimolar (mM)** :

1.5.1 Weigh **0.0065 g** of sodium azide;

 **Sodium azide Sigma**

Aldrich Catalog #S2002

1.5.2 Dissolve completely the sodium azide powder in **10 mL** of ultrapure water using a container of appropriate size;

1.5.3 Store the solution at room temperature;

1.6

Glutathione reductase (GR) **[M]0.5 U/mL** : this reagent should be prepared on the day of the biochemical assay, it should not be stored for later use;

1.6.1 Each batch of the enzyme has a specific concentration, so every time you open a new flask you should redo the calculations as follows to prepare the solution:

Liquid GR: [M]1.3 mg protein/mL or [M]214 U/mg protein:

Glutathione Reductase from bakers yeast (*S. cerevisiae*) Sigma

Aldrich Catalog #G3664

214 U - 1 mg protein
X - 1.3 mg protein

$$X = 278.2 \text{ U}$$

278.2 U - 1 mL
0.5 U - X

$$X = 0.001797 \text{ mL} = 0.002 \text{ mL} = 2 \mu\text{L}$$

1.6.2 Using a micropipette, fill a plastic microtube with 998 μL of ultrapure water;

1.6.3 Using a micropipette, collect 2 μL of the liquid GR and transfer it to the microtube containing ultrapure water, homogenizing the solution;

1.7 Hydrogen peroxide (H_2O_2) solution: Follow the steps described in section 2 of this protocol to first standardize and then prepare a hydrogen peroxide solution. This reagent should be prepared on the day of the biochemical assay, it should not be stored for later use;

Standardization of H_2O_2 solution

- 2 Every 30 days, or whenever a new bottle of hydrogen peroxide is opened, the absorbance of the concentrated solution should be checked.

Hydrogen peroxide

35% Neon Catalog #0 1984

2.1 First, we must calculate the molarity of the H_2O_2 solution in the bottle:

Concentration stated in the bottle: [M]35 % (m/v) Molecular weight: 34.0147 g/mol

1 M ----- 1 mol ----- 1000 mL
1 M ----- 34.0147 g ----- 1000 mL
x ----- 350 g ----- 1000 mL

$$x = 10.29 \text{ Molarity (M)}$$

2.2 Prepare a [M]10 Milimolar (mM) solution (10 mL) of H_2O_2 :

2.2.1 Follow the calculations below to determine the volume of the primary solution needed:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$10.29 \text{ Molarity (M)} \times V1 = 0.01 \text{ Molarity (M)} \times 10 \text{ mL}$$

$$V1 = 9.72 \mu\text{L}$$

2.2.2 Using a micropipette, collect 9.72 μL of H_2O_2 and transfer to a 10 mL volumetric flask;

2.2.3 Using ultrapure water, complete the solution's volume to reach **10 mL** ;

2.3

Read the absorbance of the solution at **240 nm** in a microplate reader;

2.4 Calculate the real concentration of your sample following these steps:

A standardized **10 Milimolar (mM)** H_2O_2 solution has an absorbance of **0.394**

$$\begin{array}{ccc} 10 \text{ mM } H_2O_2 & \text{-----} & 0.394 \text{ Abs} \\ X & \text{-----} & \text{Absorbance of your sample} \end{array}$$

X = Represents the real concentration of the hydrogen peroxide sample

2.5 Calculate the real concentration of the bottled solution following these steps:

As X (calculated on the last step) Represents the real concentration of the hydrogen peroxide sample

$$\begin{array}{ccc} 10 \text{ mM } H_2O_2 & \text{-----} & 10.29 \text{ M} \\ X & \text{-----} & Z \end{array}$$

Z = Real concentration of hydrogen peroxide in the bottle

2.6 Prepare a **1 Molarity (M)** stock solution of H_2O_2 ; this reagent should be prepared on the day of the biochemical assay, it should not be stored for later use;

2.6.1 Follow the calculations below to determine the volume of the primary solution needed:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$Z \text{ (the real concentration determined on the last step)} \times V1 = \text{1 Molarity (m)} \times$$

$$\text{10 mL}$$

V1 = depends on the concentration of your hydrogen peroxide solution

2.6.2 Using a micropipette, collect the determined volume of H_2O_2 and transfer it to a **10 mL** volumetric flask;

2.6.3 Using ultrapure water, complete the solution's volume to reach **10 mL** ;

2.6.4 Store this solution in an amber flask at **8 °C** when needed;

2.7 Prepare a **4 Milimolar (mM)** solution from your **1 Molarity (M)** stock solution:

2.7.1 Follow the calculations below to determine the volume of the stock solution needed:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$\text{1 Molarity (M)} \times V1 = \text{0.004 Molarity (M)} \times \text{10 mL}$$

$$V1 = \text{40 } \mu\text{L}$$

2.6.2 Using a micropipette, collect **40 µL** of the stock solution and transfer it to a **10 mL** volumetric flask;

2.6.3 Using ultrapure water, complete the solution's volume to reach **10 mL** ;

2.6.4 Store this solution in an amber flask at **8 °C** when needed;

Microplate preparation and absorbance reading 10m 5s

3

Use a conventional 96-well microplate to run your samples. Tissue sample collection and preparation are described elsewhere;

Adrieli Sachett, Matheus Gallas-Lopes, Radharani , Greicy M M Conterato, Ana Herrmann, Angelo Piato. How to prepare zebrafish brain tissue samples for biochemical assays.
<http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjkdks6>

3.1 You must calculate the sample volume that corresponds to **30 µg** of proteins. This calculation is based on the Bradford method described elsewhere;

Adrieli Sachett, Matheus Gallas-Lopes, Greicy M M Conterato, Radharani , Ana Herrmann, Angelo Piato. Protein quantification protocol optimized for zebrafish brain tissue (Bradford method).
<http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjnfkmbn>

3.1.1 To estimate the volume of the sample corresponding to **30 µg** of proteins, divide the amount of protein needed (**30 µg**) by the total amount of proteins in the sample quantified by the Bradford method (example below);

Volume of the sample needed for the assay (µL) = 30 µg / total amount of proteins in the sample µg/µL

3.2 Place and keep your Potassium phosphate buffer/EDTA **go to step #1.2** on a water bath at **30 °C** throughout the analysis;

3.3  5m 15s

Set your microplate reader to the following configuration: Kinetic mode with agitation; **340 nm** ;
Readings every **00:00:15** for **00:05:00** ; **30 °C** ;

3.4 Using an adequate micropipette, fill the wells of your microplate as described below. You should provide duplicates or triplicates of each sample as stated above. Using a micropipette fill the wells in this order: Tissue sample, Potassium phosphate buffer/EDTA, GSH, NADPH, NaN₃, and GR. Lastly, you

must add the H_2O_2 solution **as quickly as possible** using a multichannel pipette while being careful to homogenize the content of the wells. The Potassium phosphate buffer/EDTA volume depends on the volume of the sample. All wells should have a final volume of **250 μ L**, so the Potassium phosphate buffer/EDTA is used so that every solution reaches this volume (e.g., **50 μ L** of the sample + **75 μ L** of the Potassium phosphate buffer/EDTA + **25 μ L** of GSH + **25 μ L** of NADPH + **25 μ L** NaN_3 + **25 μ L** of GR + **25 μ L** of H_2O_2);

A	B	C	D	E	F	G	H
Well	Sample (μ L)	Potassium phosphate buffer/EDTA 0.5 M (μ L)	GSH 10 mM (μ L)	NADPH 1.6 mM (μ L)	NaN_3 10 mM (μ L)	GR 0.5 U/mL (μ L)	H_2O_2 (μ L)
Control	0	125	25	25	25	25	25
Samples	Depends on the volume of the sample corresponding to 30 μ g of proteins.	Depends on the volume of the sample. Volume needed for the final solution in the tube to reach 250 μ L. (125 - sample volume)	25	25	25	25	25

- 3.5 Read the absorbance of the samples at the set conditions. You should see the absorbance of the sample wells decrease throughout the **00:05:00** of measurement; 5m

Calculating data and determining results 8m

- 4 Choose the best **00:01:00** interval within the **00:05:00** of sampling. To do so check for the interval where the decrease between absorbances is the steepest; 6m

- 4.1 Calculate the mean absorbance of the wells containing the control solution and the wells containing your samples for each reading. Take into consideration whether you chose to use duplicates or triplicates of your samples.

- 4.2 Calculate the difference between the mean absorbance of the control samples within the **00:01:00** interval that was chosen; 1m

$$\Delta_{\text{control}} = (\text{Mean absorbance at 0 s} - \text{Mean absorbance after 60 s})$$

- 4.3 Calculate the difference between the mean absorbance of each of your samples within the **00:01:00** interval that was chosen; 1m

$$\Delta_{\text{sample}} = (\text{Mean absorbance at 0 s} - \text{Mean absorbance at 60 s})$$

- 4.4 Subtract the Δ_{control} value from the Δ_{sample} value for each of the samples;

$$\text{Absorbance of the sample } (\Delta \text{ min}) = (\Delta_{\text{sample}} - \Delta_{\text{control}})$$

4.5 Determine GPx activity:

$$\text{GPx activity} = (\Delta \text{ min} \times \text{final volume (mL)} \times 1000000 \times 1 \text{ mg}) / (6.22 \times 1000 \text{ mL} \times \text{amount of protein (mg)})$$

$$\text{GPx activity} = (\Delta \text{ min} \times 0,25 \text{ mL} \times 1000000 \times 1 \text{ mg}) / (6.22 \times 1000 \text{ mL} \times 0,03 \text{ mg})$$

$$\text{Simplifying: GPx activity} = (\Delta \text{ min} \times 250000) / 186.6$$

P.S.: $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ = molar extinction coefficients of NADPH

4.6 Final results are expressed as nmol NADPH/min/mg of protein.

ANEXO D – PROTOCOLO DE MEDIDA DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS) E O DANO OXIDATIVO ÀS PROTEÍNAS PELOS NÍVEIS DE GRUPOS TIÓIS PROTEICOS (SH) E NÃO PROTEICOS (NPSH)



Sep 08, 2020

Quantification of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) optimized for zebrafish brain tissue

Adrieli Sachett¹, Matheus Gallas-Lopes¹, Greicy M M Conterato², Radharani Benvenuti¹, Ana P Herrmann¹, Angelo Piato¹

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ²Universidade Federal de Santa Catarina

1 Works for me

Share

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjp8kmrw

Fish behavior and physiology



Angelo Piato
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

ABSTRACT

Zebrafish are increasingly used as a model animal in neuroscience research. Here we describe our protocol to quantify thiobarbituric acid reactive species (TBARS) in zebrafish brain tissue. TBARS levels are indicative of lipid peroxidation.

DOI

dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjp8kmrw

PROTOCOL CITATION

Adrieli Sachett, Matheus Gallas-Lopes, Greicy M M Conterato, Radharani Benvenuti, Ana P Herrmann, Angelo Piato 2020. Quantification of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) optimized for zebrafish brain tissue. **protocols.io**
<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjp8kmrw>

KEYWORDS

TBARS, Oxidative stress, Zebrafish brain tissue

LICENSE

This is an open access protocol distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

CREATED

Aug 13, 2020

LAST MODIFIED

Sep 08, 2020

OWNERSHIP HISTORY

Aug 13, 2020 Matheus Gallas-Lopes Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Sep 08, 2020 Angelo Piato Universidade Federal do Rio Grande do Sul

PROTOCOL INTEGER ID

40416

GUIDELINES

This protocol is intended to standardize quantification of thiobarbituric acid reactive species in zebrafish brain tissue samples. It can be adapted for other fish species.

MATERIALS TEXT

MATERIALS

-  Gloves **Contributed by users**
 -  Incubator **Contributed by users**
 -  96 well plate **Contributed by users**
 -  Eppendorf tubes 1.5 mL uncolored **Eppendorf**
Centrifuge Catalog #022363204
 -  Compact Digital Dry Bath/ Block Heater, Compact Dry Bath S, 100-240V, US plug **Thermo**
Fisher Catalog #88871001
 -  Surgical mask **Contributed by users**
 -  Micropipette (0.5 - 10 µL) **Contributed by users**
 -  Micropipette (100 - 1000 µL) **Contributed by users**
 -  Multichannel pipette (5 µL; 30-300 µL) **Contributed by users**
 -  Adhesive tape **Contributed by users**
 -  Synergy™ HTX Multi-Mode Microplate Reader **Biotek**
- #### STEP MATERIALS
-  Trichloroacetic acid (TCA) **Sigma -**
Aldrich Catalog #T6399 Step 1.1
 -  Thiobarbituric acid (TBA) **J.T. Baker** Step 1.1
 -  Malondialdehyde tetrabutylammonium salt **Sigma-**
aldrich Catalog #36357 Step 1.2
 -  Ethanol **Merck**
Millipore Catalog #100983 In 2 steps
 -  Ethanol **Merck**
Millipore Catalog #100983 In 2 steps

SAFETY WARNINGS

Use personal protective equipment (including lab coat, masks, and gloves) whenever manipulating chemical and biological samples. Make sure to read all Safety Data Sheets for the reagents.

BEFORE STARTING

This protocol was standardized at LAPCOM (Psychopharmacology and Behavior Laboratory at UFRGS) to assess biochemical parameters in zebrafish brain tissue. Protocols you should read before proceeding with this method:

Adrieli Sachett, Matheus Gallas-Lopes, Radharani Benvenuti, Greicy M M Conterato, Ana Herrmann, Angelo Piato. How to prepare zebrafish brain tissue samples for biochemical assays.
<https://protocols.io/view/how-to-prepare-zebrafish-brain-tissue-samples-for-bjkdks6>

Adrieli Sachett, Matheus Gallas-Lopes, Greicy M M Conterato, Radharani Benvenuti, Ana Hermann, Angelo Piao. Optimized protein quantification protocol for zebrafish brain tissue (Bradford method).
<https://protocols.io/view/optimized-protein-quantification-protocol-for-zebr-bjnfkmbn>

Preparing the reagents

- 1 The first step is to prepare the reagents to be used in the quantification of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) in the samples;

- 1.1 **Trichloroacetic acid (TCA) 20% + Thiobarbituric acid (TBA) 0.5%:** this reagent should be prepared on the day of the biochemical assay, it should not be stored for later use;

1.1.1 Weigh **2 g** of TCA in a beaker of appropriate size;

 **Trichloroacetic acid (TCA) Sigma**

Aldrich Catalog #T6399

1.1.2 Dissolve the TCA with **8 mL** of ultrapure water;

1.1.3 Weigh carefully **0.05 g** of TBA in a piece of aluminum foil;

 **Thiobarbituric acid (TBA) J.T. Baker**

1.1.4 Add the TBA to the solution of water + TCA. Use a heating plate to help dissolve the TBA in the solution;

1.1.5 Transfer your solution to a **10 mL** volumetric flask;

1.1.6 Using ultrapure water, complete the solution's volume to reach **10 mL** ;

- 1.2 **Malondialdehyde (MDA):** This reagent is volatile, be careful to maintain the storing flask closed;

Preparing a stock solution (1000 nmol/mL) :

1.2.1 Weigh carefully **0.00627 g** of MDA in a piece of aluminum foil;

 **Malondialdehyde tetrabutylammonium salt Sigma**

aldrich Catalog #36357

1.2.2 Transfer the MDA to a beaker of appropriate size;

1.2.3 Add, slowly, **10 mL** of absolute ethanol to the beaker to dissolve the salt;

 **Ethanol Merck**

Millipore Catalog #100983

1.2.4 Store the solution in an amber flask of appropriate size at **8 °C** ;

1.2.5 Each time you proceed with this thiobarbituric acid reactive species quantification method, prepare a **[M]20 nmol/mL** sample solution from your stock solution following the calculation below;

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$[M]2000 \text{ nmol/mL} \times V1 = [M]20 \text{ nmol/mL} \times \boxed{5 \text{ mL}}$$

$$V1 = \boxed{0.05 \text{ mL of the stock solution (} \boxed{50 \mu\text{L}} \text{)}}$$

1.2.6 Using a micropipette, collect **50 µL** of the stock solution and mix it to **4950 µL** of absolute ethanol;

 **Ethanol Merck**

Millipore Catalog #100983

1.2.7 This diluted solution should be prepared on the day of the biochemical assay, it should not be stored for later use;

Incubation of the samples + standard curve



To optimize the reaction that forms the thiobarbituric acid reactive species, an incubation step is needed. Tissue sample collection and preparation are described elsewhere;

Adrieli Sachett, Matheus Gallas-Lopes, Radharani Benvenuti, Greicy M M Conterato, Ana Herrmann, Angelo Piao. How to prepare zebrafish brain tissue samples for biochemical assays.
<https://protocols.io/view/how-to-prepare-zebrafish-brain-tissue-samples-for-bjkdks6>

- 2.1 Prepare **1.5 mL** heat resistant microtubes, to be used to store the samples, with the correct information. The number of microtubes depends on the number of samples and points of the standard curve;
- 2.2 For each point of the standard curve, fill the plastic microtubes as described below. You should provide duplicates or triplicates of each point of the curve to make your quantification more precise. Using a micropipette fill the tubes in this order: MDA solution, ultrapure water, and TCA + TBA solution (mixing the solution with the pipette tip to homogenize the content);

Point of the curve	MDA (20 nmol/mL) (µL)	Ultrapure water (µL)	TCA 2% + TBA 0.05% solution (µL)
Control (0 nmol of MDA)	0	100	150
Point 1 (0.4 nmol of MDA)	20	80	150
Point 2 (0.8 nmol of MDA)	40	60	150
Point 3 (1.2 nmol of MDA)	60	40	150
Point 4 (1.6 nmol of MDA)	80	20	150
Point 5 (2.0 nmol of MDA)	100	0	150

The final volume in all microtubes should be 250 µL.

- 2.3 Before preparing your samples for incubation, you must calculate the sample volume that corresponds to **50 µg** of proteins. This calculation is based on the Bradford method described elsewhere;

Adrieli Sachett, Matheus Gallas-Lopes, Greicy M M Conterato, Radharani Benvenuti, Ana Herrmann, Angelo Piao. Optimized protein quantification protocol for zebrafish brain tissue (Bradford method).
<https://protocols.io/view/optimized-protein-quantification-protocol-for-zebr-bjnfkmbn>

2.3.1 To estimate the volume of the sample corresponding to **50 µg** of proteins, divide the amount of protein needed (**50 µg**) by the total amount of proteins in the sample quantified by the Bradford method (example below);

Volume of the sample needed for the assay (µL) = 50 µg / total amount of proteins in the sample µg/µL

- 2.4 For each tissue sample, fill the plastic microtubes as described below. You should provide duplicates or triplicates of each sample to make your quantification more precise. Using a micropipette fill the tubes in this order: sample, ultrapure water, and TCA + TBA solution (mixing the solution with the pipette tip to homogenize the content). The water volume depends on the volume of the sample. All microtubes should have a final volume of **250 µL** , so water is used so that every solution reaches this volume (e.g. **50 µL** of the sample + **150 µL** of the TCA + TBA solution + **50 µL** of water);

Microtubes	Sample (µL)	Ultrapure water (µL)	TCA 2% + TBA 0.05% solution (µL)
Control	0	100	150
Sample	Depends on the volume of the sample corresponding to 50 µg of proteins.	Depends on the volume of the sample. Volume needed for the final solution in the tube to reach 250 µL.	150

- 2.5 All microtubes should be correctly closed and sealed with adhesive tape to avoid that the microtubes open during the incubation period;

- 2.6 Incubate all your samples at **100 °C** for **00:30:00** using a dry bath;

Reading your samples



Prepare to read the absorbance of your samples in a microplate reader;

- 3.1 Use a conventional 96-well microplate to run your samples. Before start pipetting, each well of the microplate should be marked for sample identification.. Standard curve samples and tissue samples can be read on the same plate. Transfer **200 µL** of the content of each microtube to it's corresponding well in the microplate;
- 3.2 Read the absorbance of the samples at **532 nm** in a microplate reader;

Calculating data and determining results

- 4 The calculations are based on the MDA curve (similar to the calculation of the protein curve described in other protocols);

Adrieli Sachett, Matheus Gallas-Lopes, Greicy M M Conterato, Radharani Benvenuti, Ana Herrmann, Angelo Piao. Optimized protein quantification protocol for zebrafish brain tissue (Bradford method).
<https://protocols.io/view/optimized-protein-quantification-protocol-for-zebr-bjnfkmbn>

- 4.1 Calculate the correction factor for your MDA standard curve;

4.1.1 Correction factor (CF): Subtract the absorbance value of the control point of the curve from the mean absorbance of the point you are calculating. Divide the concentration of MDA of the well/point of the curve by the resulting value from the subtraction before;

$$CF = \frac{[\text{MDA (nmol)}]}{\text{Mean Abs} - \text{Control Abs}}$$

4.1.2 Mean correction factor (MCF): The mean correction factor is calculated by the arithmetic mean of the correction factors for each point of the curve;

$$MCF = \frac{\sum \text{Correction factors}}{\text{Count of correction factors}}$$

or

$$MCF = \frac{FC_1 + FC_2 + FC_3 + FC_4 + FC_5}{5(\text{number of factors})}$$

- 4.2 The amount of thiobarbituric acid reactive species in your samples is calculated by multiplying the corrected mean absorbance of your sample to the mean correction factor calculated above;

$$TBARS = (\text{Mean absorbance of the sample} - \text{Mean absorbance of the control sample}) \times MCF$$

- 4.3 Results should be expressed as nmol of TBARS/mg of protein. To do so, divide the result obtained above for the amount of thiobarbituric acid reactive species in your sample by the amount of protein that you used of your sample (**50 µg** or **0.05 mg** in this protocol).



$\text{nmol TBARS/mg protein} = \text{nmol TBARS on the sample} / 0.05 \text{ mg of proteins}$

ANEXO E - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE ÉTICA (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**

Linagem: **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 F - EMENDA DE PRORROGAÇÃO (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 UFFS (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-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Fronteira Sul

3. RELATÓRIO DE PESQUISA

Este projeto integra o Trabalho de Curso (TC) I, desenvolvido no primeiro semestre de 2025 no curso de Medicina da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *Campus* Passo Fundo. Intitulado “Análise Bioquímica dos Efeitos Neuroprotetores da N-acetilcisteína em Peixes-zebra Submetidos ao Estresse Crônico Imprevisível”. O estudo compõe um dos subprojetos experimentais vinculados a um projeto guarda-chuva conduzido no Laboratório de Neuropsicologia Translacional (LaNT) e foi elaborado de acordo com as normas do manual de trabalhos acadêmicos da UFFS e com o regulamento do TC.

O projeto guarda-chuva já possuía aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), com vigência de 05/2021 a 05/2023 (ANEXO E). Para permitir a continuidade das atividades experimentais e a execução dos subprojetos vinculados, foi emitida uma emenda de prorrogação da aprovação ética, devidamente aprovada (ANEXO F). Dessa forma, todas as etapas previstas neste subprojeto estão amparadas pelas normas éticas e legais vigentes na pesquisa com animais.

A proposta deste subprojeto surgiu a partir de evidências científicas que indicam o estresse oxidativo como componente central na fisiopatologia de transtornos psiquiátricos e neurodegenerativos, como a depressão e a ansiedade. A N-acetilcisteína (NAC) foi selecionada no escopo do projeto guarda-chuva por suas propriedades antioxidantes, moduladoras do sistema glutamatérgico e por seu papel como precursora da glutathione — principal antioxidante endógeno do sistema nervoso central.

O objetivo principal é avaliar, sob a perspectiva bioquímica, o efeito sustentado da NAC sobre marcadores de estresse oxidativo em encéfalos de peixes-zebra (*Danio rerio*) submetidos ao protocolo de estresse crônico imprevisível (ECI), um modelo experimental amplamente utilizado para simular condições análogas ao estresse crônico humano.

O estudo possui delineamento experimental, quantitativo, controlado, randomizado e cego, de natureza analítica. Após o protocolo de ECI e a aplicação de testes comportamentais padronizados, os animais serão eutanasiados conforme as normas éticas. Os encéfalos serão dissecados sob controle rigoroso de temperatura, homogeneizados e centrifugados, permitindo a análise do sobrenadante para quantificação dos seguintes marcadores bioquímicos:

- Peroxidação lipídica, por meio de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico);

- Dano oxidativo a proteínas, pelos níveis de grupamentos tiólicos proteicos (SH) e não proteicos (NPSH);
- Atividade de enzimas antioxidantes, incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferase (GST).

O delineamento experimental prevê o uso de 24 espécimes por grupo, organizados em pools de seis encéfalos ($n = 4$), com cálculo amostral baseado em parâmetros de poder estatístico, magnitude de efeito e variabilidade esperada, fundamentado na literatura atualizada.

Por integrar um projeto guarda-chuva, este subprojeto conta com infraestrutura metodológica consolidada, protocolos validados e suporte de uma equipe multidisciplinar, garantindo padronização, rigor técnico e controle de qualidade dos dados. Essa estrutura fortalece a formação científica ao proporcionar uma aprendizagem integrada de técnicas experimentais, análise crítica e interpretação bioquímica.

Espera-se que os resultados demonstrem redução dos marcadores de dano oxidativo (TBARS, SH e NPSH) e aumento da atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GST), evidenciando o potencial efeito neuroprotetor da NAC frente ao estresse prolongado.

No último semestre do curso, está prevista a elaboração de um artigo científico com os resultados, a ser submetido à revista *Neuroscience Letters* (<https://www.sciencedirect.com/journal/neuroscience-letters/publish/guide-for-authors>). A produção do manuscrito seguirá integralmente as normas e diretrizes editoriais da revista escolhida.

Cabe ressaltar que, embora o projeto inicial previsse uma análise ampla dos marcadores de estresse oxidativo (TBARS, SH, NPSH, SOD, CAT, GPx, GST), a presente pesquisa concentrou-se na análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Essa delimitação do escopo deu-se em virtude de limitações relacionadas aos equipamentos do laboratório da universidade.

Assim, este relatório reforça o compromisso da UFFS com a pesquisa científica de excelência, com o uso ético de modelos animais e com a formação médica baseada nos pilares do ensino, da pesquisa e da extensão.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Efeito neuroprotetor da N-Acetilcisteína sobre as espécies reativas de oxigênio em peixes-zebra submetidos ao estresse crônico imprevisível

Matheus Ricardo Hoffmann de Souza¹, Ricieri Mocelin^{1,2*}

¹Laboratório de Neuropsicobiologia Translacional (LaNT), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFS), Passo Fundo/RS.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas (PPGCB), Universidade Federal da Fronteira Sul (UFS), Chapecó/RS.

* Autor correspondente:

Nome: Ricieri Mocelin

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

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

RESUMO

É amplamente aceita a ideia de que o estresse é um fator importante no desencadeamento de transtornos mentais, como a ansiedade. O estresse crônico é um potente indutor de dano oxidativo no sistema nervoso central, sendo a peroxidação lipídica um dos marcadores biológicos mais deletérios dessa condição. Este estudo investigou o efeito protetor da N-acetilcisteína (NAC), com foco exclusivo na integridade das membranas lipídicas encefálicas de peixes-zebra submetidos ao estresse crônico imprevisível (ECI) por 7 dias. Os animais foram submetidos ao protocolo de ECI durante 7 dias aos seguintes agentes estressores em horários e dias alternados: perseguição por rede, aquecimento ou resfriamento da água, aglomeração, três trocas consecutivas de tanque e exposição do dorso. No 7º dia, além da exposição ao estresse, os peixes foram submetidos ao tratamento ou não por imersão em N-acetilcisteína (NAC), fluoxetina (FLU) ou cetamina (KET) durante 20 minutos. 24 horas após o tratamento, os animais foram anestesiados e eutanasiados por resfriamento rápido, e o encéfalo foi coletado, preparado e armazenado para análise bioquímica. O dano oxidativo foi quantificado por meio dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Nossos resultados demonstraram que o ECI promoveu um aumento robusto e significativo nos níveis de TBARS, indicando uma degradação severa dos lipídios de membrana no encéfalo. O tratamento com NAC, fluoxetina (FLU) ou cetamina (KET) não induziu dano lipídico em animais não estressados, entretanto, os tratamentos com FLU e KET não foram capazes de reverter a peroxidação lipídica em animais estressados. Apesar disso, o tratamento com NAC reverteu de forma sustentada o dano lipídico causado pelo ECI. Estes dados evidenciam que a NAC pode atuar de forma sustentada após uma exposição farmacológica, atuando como um agente neuroprotetor em transtornos mentais relacionados ao estresse, impedindo especificamente a lipoperoxidação decorrente do estresse prolongado.

Palavras-chave: Peixe-zebra; N-acetilcisteína; Estresse Crônico Imprevisível; Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

The idea that stress is a major factor in the onset of mental disorders, such as anxiety, is widely accepted. Chronic stress is a potent inducer of oxidative damage in the central nervous system, with lipid peroxidation representing one of the most deleterious biological markers of this condition. This study investigated the protective effect of N-acetylcysteine (NAC) on the integrity of brain lipid membranes in zebrafish subjected to chronic unpredictable stress (CUS) for 7 days. Animals were exposed to the CUS protocol for 7 days using the following stressors applied on alternating days and at varying times: net chasing, water heating or cooling, crowding, three consecutive tank changes, and dorsal body exposure. On day 7, in addition to stress exposure, fish were either treated or not treated by immersion in N-acetylcysteine (NAC), fluoxetine (FLU), or ketamine (KET) for 20 minutes. Twenty-four hours after treatment, the animals were anesthetized and euthanized by rapid cooling, and the brain tissue was collected, processed, and stored for biochemical analysis. Oxidative damage was quantified by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels. Our results demonstrated that CUS induced a robust, significant increase in TBARS levels, indicating severe degradation of brain membrane lipids. Treatment with NAC, FLU, or KET did not induce lipid damage in non-stressed animals; however, FLU and KET treatments were unable to reverse lipid peroxidation in stressed animals. In contrast, NAC treatment sustainably reversed the lipid damage caused by CUS. These findings demonstrate that NAC may exert sustained effects following a single pharmacological exposure, acting as a neuroprotective agent in stress-related mental disorders by specifically preventing lipid peroxidation resulting from prolonged stress.

Keywords: Zebrafish; N-acetylcysteine; Unpredictable Chronic Stress; Oxidative Stress.

INTRODUÇÃO

Os transtornos mentais, como a ansiedade e a depressão, constituem um dos maiores desafios de saúde pública da atualidade, impactando severamente a carga global de doenças e os índices de mortalidade^[1,10]. A patogênese dessas condições tem sido fortemente associada ao estresse oxidativo, um estado de desequilíbrio em que o excesso de espécies reativas de oxigênio compromete a integridade das membranas neuronais por meio da peroxidação lipídica^[8]. Diante da necessidade de novas estratégias terapêuticas, a N-acetilcisteína (NAC) surge como um composto promissor devido às suas propriedades antioxidantes e neuromoduladoras^[2,5].

A NAC atua como precursor da cisteína, molécula limitante para a síntese de glutathiona, o principal antioxidante endógeno^[9]. Além disso, ela modula a neurotransmissão glutamatérgica por meio do sistema cistina/glutamato (sistema Xc⁻), auxiliando na regulação da homeostase sináptica^[3]. Evidências demonstram que a NAC é capaz de mitigar danos oxidativos e reverter comportamentos ansiosos em modelos animais submetidos a estressores persistentes^[7].

O peixe-zebra (*Danio rerio*) consolidou-se como um modelo translacional de excelência na neurociência devido à sua alta homologia genética com o ser humano e à sua complexidade comportamental^[4,6]. O modelo de Estresse Crônico Imprevisível (ECI) em peixe-zebra mimetiza com eficácia as alterações bioquímicas observadas em pacientes humanos, incluindo o aumento de marcadores de oxidação^[11]. Estudos prévios indicam que o tratamento com NAC previne o dano oxidativo mesmo sob exposição a agentes neurotóxicos^[8]. Assim, este estudo visa analisar especificamente o efeito da NAC sobre a peroxidação lipídica cerebral em peixes-zebra submetidos ao ECI.

MÉTODOS

Delineamento Experimental e Protocolo de Estresse (ECI)

Trata-se de um estudo analítico com base em análise comportamental em modelo animal. Inicialmente, 128 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^[7,12]. Após a aclimação, os animais foram alocados em aquários de 16 litros (40 x 20 x 24 cm), em 8 grupos experimentais, com 16 animais por grupo (8 machos e 8 fêmeas), sendo, 4 grupos estressados (ECI +) e 4 não (ECI -). Durante 7 dias, os animais foram expostos ao protocolo de ECI, sendo submetidos a distintos agentes estressores em horários específicos: perseguição por rede (8 min), aquecimento da água a 33 °C (30 min), resfriamento da água a 23 °C (30 min), aglomeração em béquer de 250 mL (50 min), três trocas consecutivas de tanque em 30 min e exposição do dorso (2 min). 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, 10 mg/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. 24 horas após a exposição aos tratamentos, os peixes foram anestesiados e eutanasiados por resfriamento rápido, e os encéfalos foram coletados. A concentração e o tempo de exposição às drogas foram baseados em estudos prévios^[7,12].

Para as análises bioquímicas, cada amostra foi composta por 4 cérebros dissecados, agrupados e suavemente homogeneizados em 600 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4, Sigma-Aldrich®), utilizando um pistilo de maceração descartável em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL. Os homogeneizados foram centrifugados a 10.000 g a 4 °C em centrífuga refrigerada, e o sobrenadante acondicionado em microtubos foi utilizado nos ensaios experimentais. A proteína foi quantificada pelo método do azul de *Coomassie* (Bradford, 1976), utilizando albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich®) como padrão. A avaliação do status oxidativo foi realizada por meio da análise da peroxidação lipídica, com o teste de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em duplicata. Os detalhes de cada procedimento foram descritos em estudos anteriores^[7,12], e os protocolos detalhados para a preparação de tecidos e para ensaios bioquímicos estão disponíveis no *protocols.io* (10.17504/protocols.io.bjkdkks6; 10.17504/protocols.io.bjnfkmbn; 10.17504/protocols.io.bjp8kmrw).

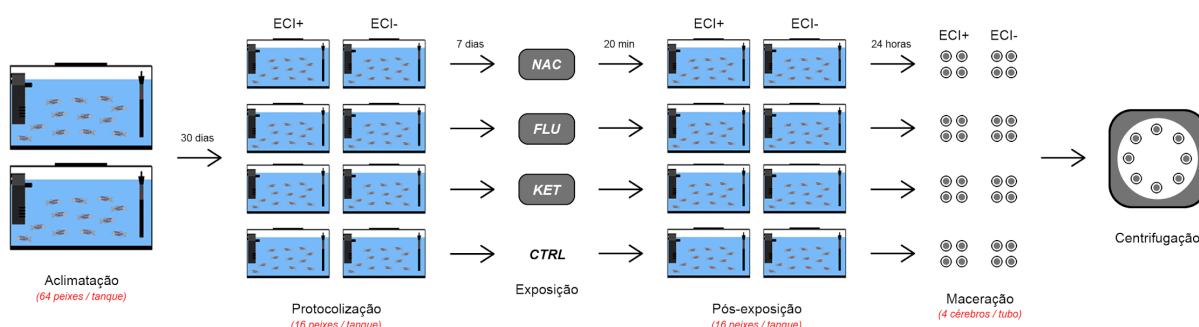


Figura 1. Fluxograma experimental: Estresse Crônico Imprevisto (ECI), N-acetilcisteína (NAC), fluoxetina (FLU), cetamina (KET), grupo controle (CTRL).

Análise de Peroxidação Lipídica (TBARS)

Para a coleta dos encéfalos, os peixes foram anestesiados e eutanasiados por resfriamento rápido. Depois, os cérebros foram dissecados e processados em *pools* de seis unidades para viabilizar as análises bioquímicas. O dano oxidativo às membranas neuronais foi avaliado pela técnica de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este método permite quantificar o grau de oxidação no tecido cerebral^[7,12]. Os resultados foram expressos em termos da concentração proteica total de cada amostra (nmol TBARS/mg de proteína).

Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Fronteira Sul, sob o protocolo nº 6.839.180.221, e obedeceu aos preceitos e às orientações contidos no manual *ARRIVE GUIDELINES*. A manipulação e os cuidados com os animais foram conduzidos de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do *National Institutes of Health* (NIH), com o objetivo de minimizar o desconforto, o sofrimento e o número de animais utilizados.

Análise estatística

A normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias foram analisadas por meio dos testes de D'Agostino-Pearson e de 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, bem como a interação entre eles. Quando a ANOVA revelou interações significativas, conduzimos comparações *post hoc* pelo teste de *Bonferroni*.

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 de gráficos.

RESULTADOS

A figura 2 demonstra o efeito de uma intervenção farmacológica com cetamina (KET), sobre a peroxidação lipídica (TBARS) em animais expostos ao estresse crônico imprevisível (ECI). Como esperado, o ECI induziu dano lipídico ($p=0,0004$). A ANOVA de duas vias demonstrou efeito do estresse ($F_{1,12} = 58,66$, $p < 0,0001$) sobre a peroxidação lipídica. Apesar disso, a KET não foi capaz de reverter o aumento da peroxidação lipídica em peixes-zebra submetidos ao ECI ($p=0,0021$), sem alterar esses parâmetros em animais não estressados.

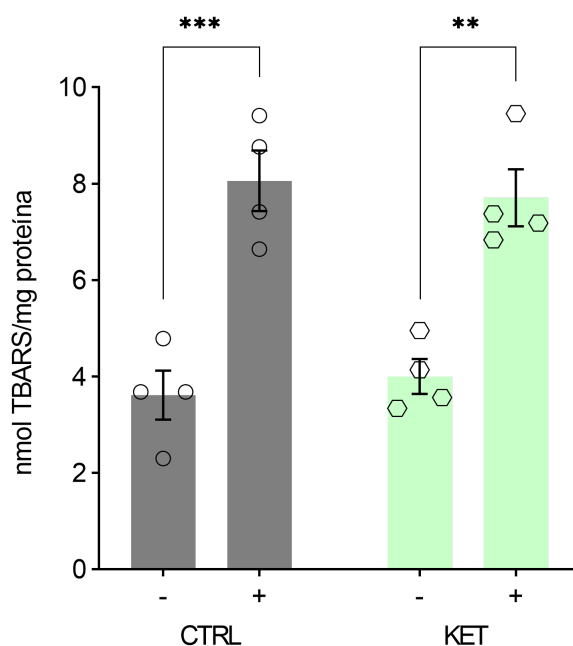


Figura 2. Efeitos do tratamento com cetamina (KET) 20 mg/L (20 minutos) sobre as alterações induzidas por estresse crônico imprevisível (ECI) nos níveis de peroxidação lipídica em encéfalos de peixes-zebra. Grupo não estressado (-); grupo estressado (+). Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). Análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de *Bonferroni*. $n = 4$. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. estresse (+).

Na Figura 3, observa-se o efeito da intervenção com fluoxetina (FLU) nos níveis de TBARS (peroxidação lipídica) em peixes-zebra submetidos ao protocolo de ECI. Novamente, o ECI induziu dano lipídico ($p=0,0039$). A ANOVA de duas vias demonstrou efeito do estresse ($F_{1,12} = 33,56$, $p < 0,0001$) sobre a peroxidação lipídica. Ademais, a FLU não atuou na proteção contra peroxidação lipídica em animais estressados ($p=0,0206$).

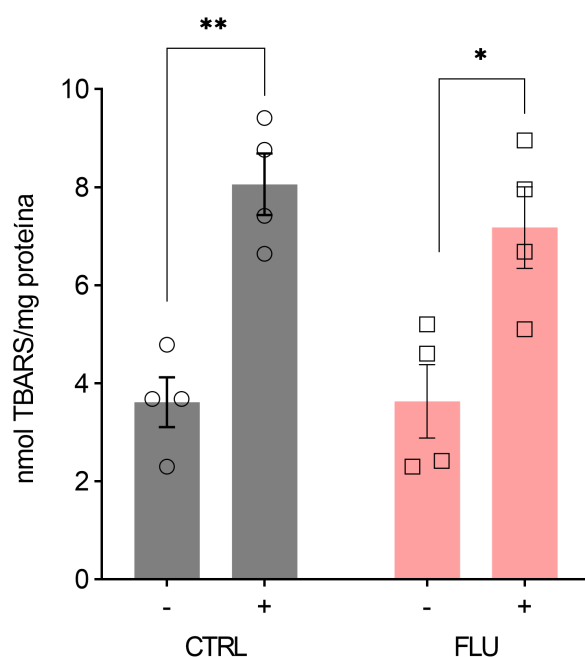


Figura 3. Efeitos do tratamento com fluoxetina (FLU) 10 mg/L (20 minutos) sobre as alterações induzidas por estresse crônico imprevisível (ECI) nos níveis de peroxidação lipídica em encéfalos de peixes-zebra. Grupo não estressado (-); grupo estressado (+). Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). Análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de *Bonferroni*. $n = 4$. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. estresse (+).

O efeito sustentado da N-acetilcisteína (NAC) sobre o dano lipídico é observado na Figura 4, na qual identificamos que a NAC reverteu o efeito do estresse sobre a peroxidação lipídica no teste de TBARS ($p = 0,0258$). Como já observado, o estresse induziu dano lipídico ($p = 0,0010$), bem como o efeito do estresse na ANOVA de duas vias ($F_{1,12} = 30,58$, $p < 0,0001$). Apesar disso, observou-se também o efeito do tratamento na ANOVA de duas vias ($F_{1,12} = 8,14$, $p = 0,0145$) na peroxidação lipídica.

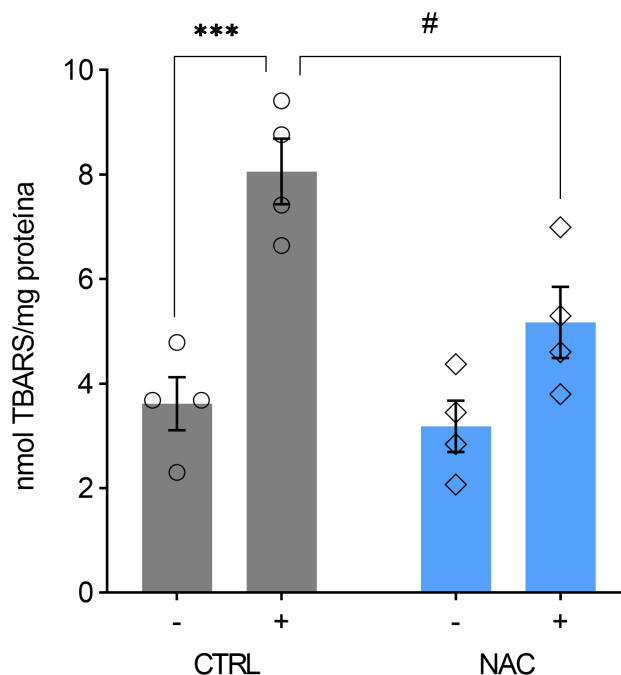


Figura 4. Efeitos do tratamento com N-acetilcisteína (NAC) 10 mg/L (20 minutos) sobre as alterações induzidas por estresse crônico imprevisível (ECI) nos níveis de peroxidação lipídica em encéfalos de peixes-zebra. Grupo não estressado (-); grupo estressado (+). Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). Análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de *Bonferroni*. $n = 4$. *** $p < 0,001$; # $p < 0,05$ vs. estresse (+).

DISCUSSÃO

Aqui, mostramos, pela primeira vez, que a N-acetilcisteína (NAC) foi capaz de reverter, de forma sustentada, a peroxidação lipídica induzida pelo estresse crônico imprevisível (ECI) durante 7 dias, após uma intervenção farmacológica de 20 minutos, bem como a ausência do efeito antioxidante dos fármacos utilizados na clínica para transtornos mentais, fluoxetina (FLU) e cetamina (KET).

O número de evidências científicas de que os transtornos mentais, como a ansiedade e a depressão, estão associados ao estresse oxidativo tem aumentado nos últimos anos^[21-25]. A fisiopatologia dos transtornos do humor, como a depressão e a ansiedade, está intrinsecamente associada à exacerbação do estresse oxidativo. Esse cenário decorre de um perfil antioxidante deficitário diante de um estresse sistêmico, deflagrando uma cascata de danos moleculares que comprometem a integridade neuronal e os circuitos de regulação emocional, por prejudicar a proteção do organismo contra as espécies reativas de oxigênio (EROs), causando danos a ácidos graxos, proteínas e DNA^[8]. Nesse contexto, agentes capazes de mitigar o dano

oxidativo surgem como potenciais estratégias terapêuticas, uma vez que tais biomarcadores estão diretamente relacionados a diversas patologias psiquiátricas^[2,20,26].

O estresse crônico é um protocolo experimental amplamente utilizado em estudos pré-clínicos, especialmente com o uso de peixes-zebra (*Danio rerio*). Este modelo destaca-se pela alta homologia genética com os humanos e pela sensibilidade do sistema neuronal a estressores^[6,14]. A literatura indica que o estresse prolongado desequilibra o sistema redox por meio da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), que degradam as membranas celulares^[13]. Nossos dados corroboram essa premissa: o ECI induziu dano lipídico significativo ao elevar os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos animais não tratados (CTRL; Figuras 2, 3 e 4), com efeitos do estresse confirmados pela ANOVA de duas vias em todas as análises ($p < 0,0001$).

Apesar de ser reconhecida por suas propriedades antidepressivas de ação rápida e por modulação de receptores NMDA e de vias de plasticidade (como a mTOR), a influência direta da cetamina sobre o *status* oxidativo parece ser dose-dependente ou exigir tempos de exposição distintos^[16,17,18]. Diante disso, observamos que a KET não reverteu o dano lipídico induzido pelo ECI, ou seja, não demonstrou atividade antioxidante relevante em comparação com os animais não estressados ($p = 0,0021$; Figura 2).

Sendo uma terapêutica consolidada como para a depressão e ansiedade, a fluoxetina apresenta um amplo histórico de uso na população^[30]. Todavia, a FLU também não protegeu o tecido encefálico contra a peroxidação lipídica ($p = 0,0206$; Figura 3). Sendo assim, a FLU parece exercer seu efeito ansiolítico prioritariamente por outras vias, por exemplo, atuando sobre mudanças graduais na plasticidade sináptica em uso prolongado^[19,27-29].

Em contrapartida, a NAC protegeu de forma sustentada o tecido encefálico contra a peroxidação lipídica induzida pelo estresse ($p = 0,0258$), mantendo a homeostase oxidativa nos animais controle ($p > 0,05$; Figura 4). A ANOVA de duas vias reforçou o impacto significativo do tratamento sobre a peroxidação ($F_{1,12} = 8,14$; $p = 0,0145$). Esse efeito protetor deve-se à atuação da NAC como precursora da L-cisteína, aminoácido limitante para a síntese de glutathione (GSH), o principal antioxidante endógeno^[15]. Ao restaurar os níveis de GSH e potencializar a neutralização de radicais livres, a NAC protege as membranas lipídicas, corroborando estudos que a posicionam como uma estratégia promissora para reverter danos oxidativos e comportamentos ansiosos^[7,11].

Em suma, os dados sugerem que a NAC oferece proteção robusta contra os danos causados pelo estresse crônico em peixes-zebra. Esses achados fortalecem a hipótese de que estratégias focadas na elevação da glutathione e na modulação glutamatérgica (um dos

mecanismos de ação da NAC) podem ser adjuntos valiosos no tratamento de transtornos mentais^[2,20]. Notavelmente, embora fármacos tradicionais, como a fluoxetina e a cetamina, não apresentassem a mesma capacidade protetora nas condições testadas, são amplamente utilizados na clínica para ansiedade e depressão. Contudo, novos estudos são fundamentais para elucidar melhor os mecanismos antioxidantes da NAC, bem como os mecanismos subjacentes, como os ao nível dos receptores glutamatérgicos, a fim de viabilizar sua aplicabilidade clínica como terapia complementar.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Bruno Zilli Peroni e Cristine Somavilla Fagundes pelo apoio prestado na realização dos experimentos desenvolvidos neste trabalho.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Matheus Ricardo Hoffmann e Ricieri Naue Mocelin participaram de todas as etapas da concepção, delineamento, aquisição, análise e interpretação dos dados, da 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 (UFFS; PES-2024-0228 e PES-2025-0311).

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores não possuem conflito de interesses a declarar.

REFERÊNCIAS

[1] T. Alvi, D. Kumar, B.A. Tabak, Social anxiety and behavioral assessments of social cognition: A systematic review, J. Affect. Disord. 311 (2022) 17-30. doi: 10.1016/j.jad.2022.04.130

- [2] M. Berk *et al.*, The promise of N-acetylcysteine in neuropsychiatry, Trends Pharmacol. Sci. 34 (2013) 167-177. doi: 10.1016/j.tips.2013.01.001
- [3] R.J. Bridges, N.R. Natale, S.A. Patel, System xc- cystine/glutamate antiporter: an update on molecular pharmacology and roles within the CNS, Br. J. Pharmacol. 165 (2012) 20-34. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01480.x
- [4] K. Chia *et al.*, Zebrafish as a model organism for neurodegenerative disease, Front. Mol. Neurosci. 15 (2023) 1-27. doi: 10.3389/fnmol.2022.940484
- [5] O. Dean, F. Giorlando, M. Berk, N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanism of action, J. Psychiatry Neurosci. 36 (2011) 78-86. doi: 10.1503/jpn.100057
- [6] A.V. Kalueff, A.M. Stewart, R. Gerlai, Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders, Trends Pharmacol. Sci. 35 (2014) 63-75. doi: 10.1016/j.tips.2013.12.002
- [7] R. Mocelin *et al.*, N-Acetylcysteine Reverses Anxiety and Oxidative Damage Induced by Unpredictable Chronic Stress in Zebrafish, Mol. Neurobiol. 56 (2019) 1188-1195. doi: 10.1007/s12035-018-1165-y
- [8] G. Raghu *et al.*, The Multifaceted Therapeutic Role of N-acetylcysteine (NAC) in Disorders Characterized by Oxidative Stress, Curr. Neuropharmacol. 19 (2021) 1202-1224. doi: 10.2174/1570159X19666201230144109
- [9] R.B. Shahripour, M.R. Harrigan, A.V. Alexandrov, N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities, Brain Behav. 4 (2014) 108-122. doi: 10.1002/brb3.208
- [10] E.R. Walker, R.E. McGee, B.G. Druss, Mortality in mental disorders and global disease burden implications: a systematic review and meta-analysis, JAMA Psychiatry 72 (2015) 334-341. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2014.2502
- [11] R. Mocelin *et al.*, N-Acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish, Pharmacol. Biochem. Behav. 139 (2015) 1-22. doi: 10.1016/j.pbb.2015.08.006
- [12] Mocelin *et al.*, Behavioral and Biochemical Effects of N-Acetylcysteine in Zebrafish Acutely Exposed to Ethanol. Neurochem Res. 43 (2): 458-464 (2018). doi: 10.1007/s11064-017-2442-2
- [13] G. Dal Santo *et al.*, Acute restraint stress induces an imbalance in the oxidative stress of the zebrafish brain, Neurosci. Lett. 558 (2014) 103-108. doi: 10.1016/j.neulet.2013.11.011
- [14] R. Mrinalini *et al.*, Zebrafish – The Neurobehavioural Model in Trend, Neuroscience 520 (2023) 95-518. doi: 10.1016/j.neuroscience.2022.12.016

- [15] G.F. Rushworth, I.L. Megson, Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits, *Pharmacol. Ther.* 142 (2014) 150-159. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.09.006
- [16] C. Andrade, Ketamine for depression, 1: Clinical Summary of Issues Related to Efficacy, Adverse Effects, and Mechanism of Action, *J. Clin. Psychiatry* 78 (2017) 415-419. doi: 10.4088/JCP.17f11567
- [17] P. Zanos *et al.*, NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites, *Nature* 533 (2016) 481-486. doi: 10.1038/nature17998
- [18] R. Riehl *et al.*, Behavioral and Physiological effects of acute ketamine exposure in zebrafish, *Neurotoxicol. Teratol.* 33 (2011) 658-667. doi: 10.1016/j.ntt.2011.05.011
- [19] A.C.V.V. Maximino *et al.*, Role of serotonin in zebrafish (*Danio rerio*) anxiety: Relationship with serotonin levels and effect of buspirone, WAY 100635, SB 224289, fluoxetine and para-chlorophenylalanine (pCPA) in two behavioral models, *Neuropharmacology* 71 (2013) 170-181. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.03.017
- [20] K. Deepmala *et al.*, Clinical trials of N-acetylcysteine in psychiatry and neurology: A systematic review, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 55 (2015) 294-321. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.04.015
- [21] G.G. Ortiz *et al.*, Oxidative stress: love and hate history in central nervous system, *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 108 (2017) 1-31. doi: 10.1016/bs.apcsb.2017.01.003
- [22] E. Niedzielska *et al.*, Oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Mol. Neurobiol.* 53 (2016) 4094-4125. doi: 10.1007/s12035-015-9337-5
- [23] S. Schiavone, M. Colaianna, L. Curtis, Impact of early life stress on the pathogenesis of mental disorders: relation to brain oxidative stress, *Curr. Pharm. Des.* 21 (2015) 1404-1412.
- [24] C.A. Cobb, M.P. Cole, Oxidative and nitrate stress in neurodegeneration, *Neurobiol. Dis.* 84 (2015) 4-21. doi: 10.1016/j.nbd.2015.04.020
- [25] F. Ng, M. Berk, O. Dean, A.I. Bush, Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 11 (2008) 851-876. doi: 10.1017/S1461145707008401
- [26] M. Maes, P. Galecki, Y.S. Chang, M. Berk, A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35 (2011) 676-692. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.05.004
- [27] R.L. Djavadian, Serotonin and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of adult mammals, *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz)* 64 (2004) 189-200. doi: 10.55782/ane-2004-1505

- [28] K. Martinowich, B. Lu, Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders, *Neuropsychopharmacology* 33 (2008) 73-83. doi: 10.1038/sj.npp.1301571
- [29] L. Santarelli *et al.*, Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants, *Science* 301 (2003) 805-809. doi: 10.1126/science.1083328
- [30] M. Hurst, H.M. Lamb, Fluoxetine: A review of its use in anxiety disorders and mixed anxiety and depression, *CNS Drugs* 14 (2000) 51-80. doi: 10.2165/00023210-200014010-00005

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a finalização das etapas experimentais, análise estatística e redação do manuscrito, constata-se o cumprimento parcial das metas propostas inicialmente nesta pesquisa. O estudo evidenciou o impacto deletério do protocolo de Estresse Crônico Imprevisível (ECI) de 7 dias sobre o perfil oxidativo em peixes-zebra, caracterizado pelo desencadeamento de dano lipídico encefálico. Ademais, validou-se o potencial antioxidante da N-acetilcisteína (NAC), que demonstrou uma capacidade sustentada de reverter a peroxidação lipídica após uma exposição de 20 minutos, um efeito protetor que não foi observado nos psicofármacos clínicos de referência, fluoxetina (FLU) e cetamina (KET). Desse modo, valida-se o êxito no cumprimento dos requisitos acadêmicos estabelecidos para os Componentes Curriculares (CCr) de Trabalho de Curso I, II e III, consolidando a execução de uma investigação científica rigorosa.

Os achados revelaram que a exposição ao estresse contínuo rompe o equilíbrio redox dos animais, culminando em uma severa degradação das membranas celulares decorrente do acúmulo de TBARS. No que tange às intervenções farmacológicas, tanto a fluoxetina quanto a cetamina falharam em reverter esse dano tecidual a curto prazo, indicando que suas propriedades terapêuticas clássicas parecem depender de mecanismos independentes da via oxidativa direta. Por outro lado, a NAC mitigou de forma robusta a peroxidação lipídica, muito provavelmente por atuar como precursora na síntese de glutathiona endógena (GSH). Diante da eficácia demonstrada e da relevância translacional desse composto, a NAC se consolida como uma abordagem adjunta promissora para o manejo de disfunções neuropsiquiátricas associadas ao estresse oxidativo.

Contudo, reconhece-se a necessidade de investigações adicionais para elucidar por completo os mecanismos moleculares subjacentes a esses achados, especialmente no que concerne à modulação dos receptores glutamatérgicos, mapeando como essa via interage com o sistema redox para viabilizar uma aplicação clínica segura como terapia complementar. Portanto, os resultados gerados por esta investigação subsidiarão etapas subsequentes deste projeto. Estes dados serão integrados a futuros delineamentos experimentais com o intuito de compor um manuscrito ampliado, direcionado para submissão e publicação no periódico *Neuroscience Letters*, sob o título de “Efeito neuroprotetor da N-Acetilcisteína sobre as espécies reativas de oxigênio em peixes-zebra submetidos ao estresse crônico imprevisível”.