

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

GUILHERME LODETTI DA SILVA

**AVALIAÇÃO NEUROQUÍMICA E DO COMPORTAMENTO DE
AQUISIÇÃO DE MEMÓRIA RELACIONADA AO USO
REPETITIVO DO ÁLCOOL EM PEIXE-ZEBRA**

CRICIÚMA, 2021

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

GUILHERME LODETTI DA SILVA

**AVALIAÇÃO NEUROQUÍMICA E DO COMPORTAMENTO DE
AQUISIÇÃO DE MEMÓRIA RELACIONADA AO USO
REPETITIVO DO ÁLCOOL EM PEIXE-ZEBRA**

Dissertação de Mestrado apresentado
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde para obtenção do
título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Pacheco
Rico

CRICIÚMA, 2021

FOLHA INFORMATIVA

Essa dissertação foi elaborada seguindo a resolução 07/2015 do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

S586a Silva, Guilherme Lodetti da.
Avaliação neuroquímica e do
comportamento de aquisição de memória
relacionada ao uso repetitivo do álcool em
peixe-zebra / Guilherme Lodetti da Silva.
- 2021.

53 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade
do Extremo Sul Catarinense, Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
Criciúma, 2021.

Orientação: Eduardo Pacheco Rico.

1. Álcool - Consumo. 2. Álcool -
Efeito fisiológico. 3.
Neurotransmissores. 4. Memória. 5.
Comportamento - Modificação. I. Título.

CDD 23. ed.
616.861

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB
14/1101

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 386

Com início às 15h30 (quinze horas e trinta minutos) de vinte e um de dezembro de 2021 (dois mil e vinte e um), realizou-se, via ferramenta digital *Google Meet*, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de GUILHERME LODETTI DA SILVA, sob a orientação do Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico, intitulada “AVALIAÇÃO NEUROQUÍMICA E DO COMPORTAMENTO DE CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA RELACIONADA AO USO REPETITIVO DO ALCÓOL EM PEIXE-ZEBRA”. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, Prof. Dr. Emilio Luiz Streck (Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC) – Conceito final: Aprovado e Prof. Dr. Denis Brook Rosemberg (Universidade Federal de Santa Maria - UFSM) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: APROVADO, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 17h (dezessete horas), dos quais eu, Fernanda Nunes Peruchi, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Emilio Luiz Streck, Coordenador do Programa. Criciúma, 21 (vinte e um) de dezembro de 2021 (dois mil e vinte e um).

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

Fernanda Nunes Peruchi
Assistente Administrativo

*“Tornamos nosso mundo significativo
pela coragem de nossas perguntas e
pela profundidade de nossas
respostas”
Carl Sagan*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao universo, pela possibilidade de existir neste planeta maravilhoso que chamamos de Terra, e com isso, buscar o aprendizado sempre.

À Universidade do Extremo Sul Catarinense, que proporcionou as bases para o meu crescimento pessoal e profissional.

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pelo conhecimento compartilhado ao longo desses dois anos.

À CAPES e ao CNPq pela bolsa disponibilizada para a realização dessa pesquisa.

À equipe do Laboratório de Psiquiatria Translacional, Grupo de Pesquisa em Alcoolismo e todos que conviveram comigo no Laboratório 007, pelas conversas inteligentes, trocas de ideias e apoio, que contribuíram imensamente para a realização deste trabalho: Bela, Cinara, Duda, Edu, Gabi, Henrique, Helo, Karol, Leila, Mai.

Ao meu orientador e amigo professor Dr. Eduardo Pacheco Rico por ter me dado a oportunidade de evoluir na pesquisa e pelos “brain storms” e conversas profundas sobre ciência, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigado pelo apoio, paciência e dedicação!

À minha querida Tatielle, que sempre me apoiou durante todo este processo. Sou extremamente grato por ter você na minha vida neste momento tão importante.

Agradeço imensamente a meus pais e meus irmãos por todo o suporte e amor a mim dedicado. O amor de vocês é o bem mais precioso que possuo!

RESUMO

O peixe-zebra demonstra ser sensível ao álcool, apresentando resposta a estímulos de recompensa, tolerância e também exibe comportamentos de abstinência. O álcool é uma substância largamente consumida no mundo todo e seu uso abusivo pode causar disfunções cognitivas e afetar a memória e o aprendizado devido a várias mudanças neurofisiológicas. O álcool está relacionado em comprometer a formação da memória devido ao desequilíbrio causado nos sistemas de diversos neurotransmissores, sendo os principais, o sistema colinérgico e glutamatérgico. Dessa forma, este estudo teve como objetivo investigar a neurotransmissão glutamatérgica e colinérgica, e o comportamento de aquisição de memória, utilizando o protocolo de exposição repetitiva ao etanol (REE) (1% v/v) seguido da administração intraperitoneal de dizocilpina (MK-801) em peixe-zebra. Durante a fase experimental os animais foram divididos em quatro grupos: Controle, MK-801, REE e REE+MK-801. Ao longo de oito dias, os animais foram expostos uma vez ao dia, durante 20 minutos ao etanol. No oitavo dia foram realizados os testes de esQUIVA inibitória e de reconhecimento de objeto, para a avaliação dos parâmetros relacionados à memória. Após esta etapa, os animais foram eutanasiados e os encéfalos retirados para a avaliação da sinalização colinérgica através de atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e colina acetiltransferase (ChAT). A sinalização mediada pelo glutamato foi avaliada através da verificação dos seus transportadores e quantificação dos seus níveis. A partir dos testes comportamentais, foram observados efeitos deletérios na memória de aprendizado causado pela exposição ao etanol e pela ação farmacológica do MK-801. Ao avaliar a sinalização colinérgica, verificou-se uma redução da atividade da ChAT no grupo REE+MK-801 e um aumento da atividade da AChE no grupo REE. Em relação ao sistema glutamatérgico, foram observadas reduções dos níveis de glutamato nos grupos REE e REE+MK-801. Diante dos resultados obtidos, pode-se sugerir que a exposição ao etanol influencia negativamente na aquisição da memória, e que tais efeitos podem estar relacionados com as disfunções de sistemas de neurotransmissão glutamatérgica e colinérgica no sistema nervoso central do peixe-zebra. Portanto, estes resultados permitem uma maior compreensão sobre as mudanças neurofisiológicas e comportamentais ocasionadas pelo uso repetitivo do álcool.

Palavras-chave: Álcool; Peixe-zebra; Neurotransmissores; Memória; Comportamento.

ABSTRACT

Zebrafish has shown to be sensitive to alcohol, responding to reward stimuli, tolerance and also, exhibit withdrawal behaviors. Alcohol is a widely consumed worldwide substance and its abuse can cause cognitive dysfunction affecting memory and learning due to several neurophysiological changes. Alcohol is related to memory deficits due to the imbalance caused in several neurotransmitters, including cholinergic and glutamatergic systems. Thus, this work aimed to investigate the cholinergic and glutamatergic neurotransmission and the memory acquisition behavior, using the protocol of repetitive exposure to ethanol (REE) (1% v/v) followed by the intraperitoneal administration of MK-801 in zebrafish. During the experimental phase, the animals were divided into four groups: Control, MK-801, REE and REE+MK801. Over eight days, the animals were exposed once a day for 20 minutes to ethanol. On the eighth day, inhibitory avoidance and object recognition tests were performed to assess memory parameters. After this step, animals were euthanized and their brains were removed for the evaluation of cholinergic signaling through the activity of acetylcholinesterase and colineacetyltransferase enzymes. The signaling mediated by glutamate was evaluated by verifying its transporters quantifying its levels. About the behavioral tests, were observed deleterious effects on learning memory behavior caused by the exposure to ethanol and the pharmacological action of MK-801. When the cholinergic system was evaluated, the results showed a reduction in ChAT activity in the REE+MK-801 group and an increase in AChE activity in the REE group. Regarding the glutamatergic system, a reduction in glutamate levels were observed in the REE and REE+MK-801 groups. Considering the results obtained, it can be suggested that exposure to ethanol causes deficits in memory consolidation, and such deleterious effects are related to dysfunctions in glutamatergic and cholinergic neurotransmission systems. Therefore, these results allow for a better understanding of the neurophysiological and behavioral changes caused by the repetitive use of alcohol.

Key-words: Alcohol; Zebrafish; Neurotransmitters; Memory; Behavior.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação esquemática da sinalização colinérgica.	12
Figura 2: Delineamento experimental.	21
Figura 3: Aparato da Esquiva Inibitória.	22
Figura 4: Protocolo de teste de Reconhecimento de Objeto.	24
Figura 5: Avaliação do efeito da exposição repetitiva ao etanol nos grupos MK-801, REE e REE + MK801 sobre a capacidade de aquisição de memória frente à um estímulo aversivo no aparato de Esquiva Inibitória.	28
Figura 6: Avaliação do efeito da exposição repetitiva ao etanol nos grupos MK-801, REE e REE + MK801 sobre a capacidade de aquisição de memória no teste de Reconhecimento de Objeto.	29
Figura 7: Avaliação dos níveis de glutamato em cérebro de peixe-zebra, por CLAE, após protocolo de exposição repetitiva ao etanol.	30
Figura 8: Avaliação da captação total de glutamato em cérebro de peixe-zebra, após protocolo de exposição repetitiva ao etanol.	30
Figura 9: Efeito da exposição repetitiva ao etanol sobre a atividade das enzimas colinacetiltransferase (ChAT) (A) e acetilcolinesterase (AChE) (B) em cérebro total de peixe-zebra..	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-PDS – 4’4 ditiopiridona

4-TP – 4-tiopiridona

Acetil-CoA – Acetil coenzima A

ACh – Acetilcolina (do inglês, *acetylcholine*)

AChE – Acetilcolinesterase (do inglês, *acetylcholinesterase*)

AcSCh – Iodeto de acetiltiocolina (do inglês, *acetylthiocholine iodide*)

ANOVA – Análise de Variância

AMPA - alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

CEUA – Comissão de Ética do Uso de Animais

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DTNB – Ácido ditionitrobenzóico (do inglês, *dithionitrobenzoic acid*)

EAAT – Transportador de aminoácido excitatório (do inglês, *excitatory amino acid transporter*)

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético (do inglês, *ethylenediaminetetraacetic acid*)

HBSS – Solução salina balanceada de Hank (do inglês, *Hank balanced saline solution*)

HDAC – Histona deacetilase

LTD – Depressão de longa duração (do inglês, *Long-term depression*)

LTP – Potenciação de longa duração (do inglês, *Long-term potentiation*)

MK-801 – Maleato de dizocilpina

NMDA – N-metil-D-aspartato

NMDAr – Receptores NMDA (do inglês, *NMDA receptors*)

PBS – Tampão fosfato-salina (do inglês, *phosphate buffered saline*)

REE – Exposição Repetitiva ao Etanol

SNC – Sistema Nervoso Central

vAChT – Transportador vesicular de acetilcolina (do inglês, *vesicular acetylcholine transporter*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Álcool e alcoolismo.....	9
1.2 Sistema colinérgico	10
1.3 Sistema glutamatérgico	12
1.4 Memória	13
1.5 Peixe-zebra como modelo experimental	15
1.6 Justificativa	17
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Animais	19
3.2 Cálculo amostral e organização dos grupos experimentais	19
3.3 Grupos	20
3.4 Desenho experimental	20
3.5 Testes comportamentais	21
3.5.1 Teste da esQUIVA inibitória.....	21
3.5.2 Teste de reconhecimento de objeto	23
3.6 Parâmetros de avaliação do sistema glutamatérgico	24
3.6.1 Captação de glutamato	24
3.6.2 Níveis de glutamato em CLAE	25
3.7 Parâmetros de avaliação do sistema colinérgico	25
3.7.1 Atividade de colina acetiltransferase (ChAT)	25
3.7.2 Atividade de acetilcolinesterase (AChE).....	26
3.8 Dosagem de proteínas	26
3.9 Análises estatísticas.....	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Parâmetros comportamentais	27

4.2 Parâmetros glutamatérgicos	29
4.3 Parâmetros colinérgicos	31
5. DISCUSSÃO.....	32
6. CONCLUSÃO	40
7 REFERÊNCIAS.....	41
ANEXO.....	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 Álcool e alcoolismo

O etanol é uma substância psicoativa, incolor, obtida através da fermentação e está presente em todas as bebidas alcóolicas. Tem sido utilizada por diversas culturas durante séculos em rituais festivos e religiosos (McGovern, 2009). Contudo, a modificação social e econômica das sociedades modernas, resultou em grande produção e distribuição dessa substância ao redor do mundo, alterando seu padrão de consumo ao longo das décadas. Dessa forma, seu uso abusivo é considerado um fator de risco, aumentando casos de mortalidade e morbidade (Gigliotti e Bessa, 2004; NIAAA, 2013).

O etanol é amplamente utilizado no mundo todo e seu consumo excessivo está relacionado com diversos problemas de saúde pública (WHO, 2014). Além disso, o uso crônico do álcool pode tornar o indivíduo tolerante, e com isso, aumentar as chances da procura pela droga, ampliando a possibilidade de desenvolver o vício (Holcombe et al, 2013). A respeito disso, outro problema comum gerado pelo uso do etanol é a própria interrupção do hábito, que gera síndromes de abstinência, aumentando os níveis de estresse e ansiedade do indivíduo (Koob e Wolkow, 2016). Por isso, dependentes tendem a consumir mais álcool a fim de evitar os sintomas negativos ocasionados pelas crises de abstinência, que estão relacionados a hiperatividade do sistema nervoso, como tremores, insônia e ansiedade (NIAAA, 2013).

A prevalência de pessoas que possuem algum tipo de problema com essa substância é alta, e resulta em grandes impactos para a sociedade, relacionado a crimes e custos com o sistema de saúde, devido à grande susceptibilidade de indivíduos alcoolistas em desenvolver doenças neurológicas severas (Shield et al, 2012). A nível comportamental, os efeitos do álcool podem apresentar perfil bifásico dependendo da quantidade de etanol e/ou tempo de administração (Tran e Gerlai, 2013). Doses baixas ou por pouco tempo de uso, induzem efeito ansiolítico, relacionado ao estímulo de neurotransmissores gabaérgicos, podendo gerar perda de função motora, desorientação e sedação, enquanto doses altas ou por tempo prolongado de uso induzem efeitos ansiogênicos através do estímulo de neurotransmissores glutamatérgicos (White et al., 2000).

Algumas das mudanças neurofisiológicas ocasionadas pelo consumo excessivo do álcool são: atividade metabólica reduzida, atrofia cortical e desequilíbrio de neurotransmissores (aumento da atividade

gabaérgica e redução e atividade glutamatérgica) (De White et al, 2004). O álcool também gera alterações cognitivas no hipocampo e em tarefas que dependem dessa estrutura, em vista disso, processos cerebrais como a memória e o aprendizado podem sofrer severas mudanças causadas por desequilíbrios neurofisiológicos, que estão relacionados ao abuso de substâncias psicoativas (Vik et al, 2004).

Eventos relacionados a alterações em mecanismos de plasticidade celular e sináptica, como mudanças adversas na morfologia neuronal e espinhal, comunicação neuronal e aumento de morte neuronal são consequências comuns ao uso do álcool. No cérebro, o etanol é capaz de gerar danos neurocomportamentais através do prejuízo na sinalização de diversos neurotransmissores, e seus efeitos podem durar por longos períodos de tempo (Adermark et al, 2011; Patten et al, 2013)

1.2 Sistema colinérgico

A acetilcolina (ACh), foi o primeiro neurotransmissor identificado e é utilizado por todos os neurônios colinérgicos. Os pré e pós neurônios parassimpáticos e simpáticos utilizam a ACh para realizar a sinalização neural, por isso, esse neurotransmissor possui importante função no sistema nervoso periférico e central (Ferreira-Vieira et al, 2016). Os neurônios colinérgicos estão amplamente distribuídos no sistema nervoso central (SNC), principalmente encontrados no estriado, tubérculo olfatório, medula espinhal, região mesopontina, habênula medial e no cérebro posterior (Woolf e Butcher, 2011).

O sistema colinérgico modula importantes processos neuronais e fisiológicos como a atenção, aprendizado, memória, resposta ao estresse, sono, informação sensorial e neurogênese (Lucas-Meunier, 2003). Além disso, o sistema colinérgico está envolvido na aquisição, codificação, consolidação, extinção e reativação da memória (Winters e Bussey, 2005; Boccia et al, 2009).

A neurotransmissão colinérgica se dá através de proteínas responsáveis por realizar a síntese, o armazenamento, o transporte e a degradação da ACh (Rao e Jacobson, 2006) A síntese de ACh é feita no citoplasma dos neurônios colinérgicos, pela enzima ChAT (ChAT), utilizando acetil coenzima-A provinda da mitocôndria das células e colina, obtida através da alimentação (Smythies, 2005).

Após esse processo, o neurotransmissor é transportado do citosol para dentro das vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de acetilcolina (vAChT). Após a despolarização, a ACh sofre exocitose e alcança a fenda sináptica, ligando-se a seus receptores muscarínicos

(mAChR) e nicotínicos (nAChR) (Rao e Jacobson, 2006). Posteriormente, é degradada pela enzima (AChE), que é regulada principalmente através da despolarização neuronal (Smythies, 2005) (Figura 1).

O sistema colinérgico está fortemente associado a cognição, emoção e modulação da atividade elétrica cerebral, portanto, variações na homeostase desse sistema pode resultar em déficits cognitivos, como a demência. Danos à memória e ao aprendizado relacionados ao consumo do álcool, podem ter conexão com disfunções desse sistema (Sarter e Bruno, 1997).

O álcool pode interagir com os mecanismos de neurotransmissão colinérgica, principalmente reduzindo a atividade das enzimas responsáveis pela síntese e degradação da acetilcolina (ChAT e AChE), diminuindo os níveis de ACh na fenda sináptica (Floyd et al, 1997). O prejuízo do sistema colinérgico, também pode ser mediado, através do estresse oxidativo relacionado ao consumo do etanol (Tiwari e Chopra, 2013).

Além disso, a sinalização promovida pela ACh é suscetível ao estresse, sendo assim, processos estressantes podem interferir negativamente nos processos de formação da memória, principalmente mediada através da atenção reduzida ocasionada por momentos de estresse (Newman et al, 2001). Um estudo demonstrou que a facilitação da transmissão colinérgica, utilizando inibidores da colinesterase elevou a capacidade de atenção em humanos, e dessa forma, obtiveram uma melhor capacidade de lembrar as atividades realizadas (Bracco et al, 2014).

Para mais, muitos neurônios colinérgicos são prejudicados ou totalmente perdidos na doença de Alzheimer, sendo um dos motivos para o decréscimo da capacidade de memória desses indivíduos (Balin, 2011; Chauhan, 2016).

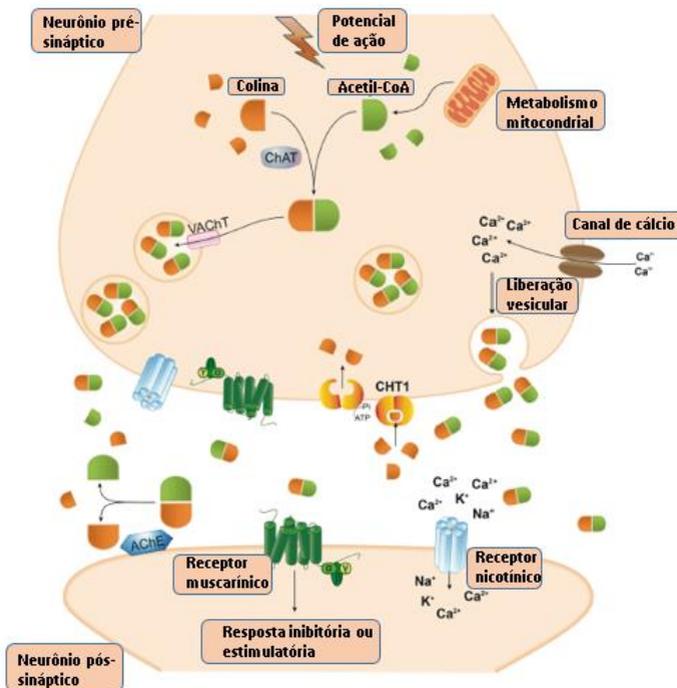


Figura 1: Representação esquemática da sinalização colinérgica. A acetilcolina (ACh) é sintetizada no citosol dos neurônios colinérgicos pré-sinápticos pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) a partir da colina e acetil-CoA, e armazenada em vesículas. É transferida para a fenda sináptica pelos transportadores vesiculares de acetilcolina (vAChT), podendo ligar-se a seus receptores específicos (muscarínicos e nicotínicos). Após ser liberada na fenda sináptica e interagir com seus receptores, pode ser degradada pela enzima Acetilcolinesterase, gerando colina e acetato. Fonte: Adaptado de Ferreira-Vieira et al (2016).

1.3 Sistema glutamatérgico

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC e participa de diversos processos fisiológicos importantes, estando fortemente envolvido em funções de memória, aprendizado e cognição. (Danbolt, 2001; De White, 2004). O desenvolvimento do SNC também está associado à atividade do glutamato, além de funções de indução de sinapses, migração, diferenciação e morte celular (Vallano, 1998; Quinlan et al, 1999).

Receptores de glutamato estão presentes de forma abundante nas membranas plasmáticas dos neurônios do SNC, e podem ser ativados por canais de íons ou através de proteínas que mediam um segundo mensageiro (Sattler e Rothstein, 2006). Os receptores de glutamato no sistema nervoso dos mamíferos são divididos em ionotrópicos (NMDA, cainato e AMPA) e metabotrópicos. (Danbolt, 2001; Mameli, 2005). Os receptores NMDA são ligados a canais iônicos dependentes de voltagem e são permeáveis ao cálcio e a cátions monovalentes de sódio (Na^+) e potássio (K^+) (Sattler e Rothstein, 2006). Tais receptores estão envolvidos em muitos processos fisiológicos e patológicos, como plasticidade sináptica, neurotoxicidade e convulsões (Mira et al, 2020).

Além disso, o consumo de etanol é amplamente associado a uma reação atenuante da liberação de glutamato pelos neurônios pré-sinápticos, e com isso, pode reduzir a captação de glutamato no córtex. Contudo, esses receptores podem sofrer modulação positiva após o consumo crônico do etanol, e quando em estado de abstinência, pode gerar uma condição de hiperexcitabilidade no cérebro (Paoletti e Neyton, 2007; Chefer et al, 2011).

Outro efeito deletério importante ocasionado pelo bloqueio dos receptores NMDA através do uso do álcool, é a apoptose neuronal, que pode resultar em massa cerebral reduzida e distúrbios neurocomportamentais (Bird et al, 2019). Os receptores de glutamato AMPA também podem modular a interação social e o comportamento. Em roedores, ligantes que ativam esses receptores específicos geram respostas melhoradas no comportamento social e na memória (Dannenhoffer et al, 2018).

1.4 Memória

Evolutivamente a memória se tornou uma capacidade muito importante para diversos animais, pois é considerada uma das principais funções relacionadas ao cérebro (Allen, 2013). Dessa forma, permite o aprendizado de muitas situações através de experiências prévias e habilita a previsão de ações futuras, possibilitando a retenção de informações ao longo do tempo (Beckinshtein, 2007). A memória possui 3 estágios: aquisição da informação obtida do ambiente, formação da memória e posteriormente a evocação (Provensi, 2018).

Nos mamíferos, existem diferentes tipos de memórias, que são obtidas por processos distintos no cérebro: memória de trabalho e as memórias de curta, média e longa duração (Izquierdo et al, 1999;). Memórias de trabalho e de curta duração, embora realizadas por

mecanismos cerebrais distintos, são adquiridas e esquecidas rapidamente, pois servem para analisar cada processo sensorial em relação a contexto em que a situação ocorre. Já as de média duração, servem para realizar atividades mais complexas, e as de longa duração, estão relacionadas ao aprendizado e a conteúdos emocionais (Izquierdo, 2018).

Os processos de memória são regulados por diferentes áreas e sistemas cerebrais. As principais áreas do cérebro relacionadas à capacidade de memória são o hipocampo, essencial para a sua consolidação, pois conecta as regiões do neocórtex que precisam ser associadas para a formação de uma memória (Izquierdo et al, 2016; Stangelo et al, 2018). Grande parte desse processo ocorre durante o sono, por esta razão, distúrbios relacionados a capacidade de dormir influenciam negativamente a formação da memória.

Além disso, o cerebelo tem importante função na formação do aprendizado e as amígdalas estão relacionadas a codificação e recuperação das memórias, que estão ligadas à parte emotiva do cérebro (Bianchin et al, 1999). Por necessidade de sobrevivência, o cérebro evoluiu facilitando o armazenamento de memórias formadas em momentos de grande emoção, logo, há dificuldade em deletar memórias de medo, facilitando o aprendizado de situações aversivas e auxiliando o processo de tomada de decisão frente tais circunstâncias (Allen, 2013; Guzman-Vélez et al, 2015; Izquierdo et al, 2016).

A capacidade de formação da memória também é determinada geneticamente, visto que as regiões corticais e subcorticais do cérebro possuem assinaturas genéticas distintas. Genes preferencialmente expressos na região cortical estão ligados a processos relacionados a memória, além da regulação imune e epigenética (Plomin et al, 2010). Genes expressos em região subcortical estão associados a neurogênese e a diferenciação das células da glia. Já os genes expressos tanto na região cortical como subcortical estão envolvidos na regulação da transcrição, plasticidade sináptica e também na sinalização dos receptores de glutamato. Portanto, as memórias são codificadas pelas ligações de projeções dos neurônios corticais (Plomin et al, 2010; Izquierdo, 2018).

Alguns interneurônios gabaérgicos, tem a função de inibir essas projeções neuronais, modulando diversas respostas sensoriais da memória (Cummings e Clem, 2020). Ademais, alguns neurotransmissores como a dopamina e a noradrenalina podem interagir com sistemas bioquímicos definidos nos locais de formação da memória, principalmente no hipocampo, e ampliar sua consolidação (Liu et al, 2020). Estudos demonstraram que após uma única atividade física, elevações nos níveis de dopamina no hipocampo são detectados,

permitindo uma maior persistência da memória nos testes realizados (Vargas et al, 2019).

O uso do etanol em altas doses pode causar disfunções agudas na formação de memória, onde os indivíduos são incapazes de lembrar os eventos ocorridos posteriormente à intoxicação por álcool, resultando em amnésia temporária ou blackout (apagão), principalmente relacionados às disfunções cognitivas consequentes do uso do álcool (White et al, 2000; Lee et al, 2009).

Em mamíferos, os apagões induzidos pelo uso do etanol afetam majoritariamente o hipocampo e a estrutura medial temporal, devido aos altos níveis de álcool presente no sangue que atingem o cérebro e impedem a consolidação da memória (Miller e Matzel, 2000). Os apagões ocasionados pelo álcool ocorrem devido a falha cognitiva gerada, impedindo que informação obtida em uma memória de curto prazo seja transformada apropriadamente em memória de longo prazo (Siqueira e Smith, 2015). O álcool está relacionado às alterações no funcionamento da memória devido ao desequilíbrio causado nos diversos sistemas de neurotransmissores, sendo os principais, o colinérgico e o glutamatérgico (Sarter e Bruno, 1997; Rico et al, 2011). Nesse sentido, há a possibilidade de usar substâncias que interagem com esses sistemas para avaliar os efeitos comportamentais e neuroquímicos consequentes dessa interação.

O maleato de dizocilpina (MK-801) é um antagonista não competitivo dos receptores ionotrópicos de glutamato N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e já demonstrou eficiência em diversos estudos avaliando a indução da perda de memória ou sintomas de esquizofrenia (Blank et al, 2009; Xiao et al, 2019; Bertonecello et al, 2019; Francescon et al, 2020). Visto que a ativação dos receptores glutamatérgicos NMDA estão relacionados a processos de aprendizado e memória, o uso do MK-801 se dá como uma ferramenta importante para avaliar a disrupção nesse sistema, uma vez que se liga a esses receptores, impedindo a conexão com glutamato para a neurotransmissão (Ng et al, 2012).

1.5 Peixe-zebra como modelo experimental

O peixe-zebra é um pequeno teleosteo (3 a 4 cm) de água doce pertencente à família Cyprinidae. Tem sido amplamente utilizado como modelo experimental em diversas áreas do conhecimento, tais como: genética, neurociência, farmacologia, biologia do desenvolvimento, comportamento e toxicologia (Cerutti e Levin, 2008). Por possuir grande homologia genética com os seres humanos (70 – 80%), este modelo vem sendo utilizado largamente em diversos estudos a respeito dos efeitos do

álcool e suas consequências neurofisiológicas e comportamentais (Barbazuk et al, 2000; Stern e Zon, 2003; Rosemberg et al, 2012). Visto que a utilização do peixe zebra como modelo animal em pesquisas com o álcool tem se mostrado bem-sucedidas, é possível ter segurança na aplicabilidade deste modelo com a finalidade de avaliar os efeitos do álcool no SNC (Khan et al, 2017; Alexandre et al, 2019).

Já foram descritos protocolos de exposição ao álcool, utilizando o peixe zebra em estudos sobre sistemas de neurotransmissores, como o colinérgico e o glutamatérgico (Rico et al, 2007; Agostini, 2017).

O peixe-zebra absorve substâncias de forma eficiente pela água, acumulando-os em diferentes tecidos, dentre os quais o SNC, e assim, facilita sua utilização como modelo para investigar as relações entre fármacos e drogas de abuso. (Rico et al, 2007; Aslop e Wood, 2011; Bertonecello et al, 2019). Devido a diversos estudos que obtiveram resultados importantes a respeito da neuropatogênese relacionada ao uso do álcool, o peixe-zebra se mostra essencial para o entendimento das bases neuroquímicas do alcoolismo, sendo também, fundamental na realização de testes com fármacos que possibilitam o tratamento de diversas doenças, inclusive o alcoolismo (Tran, 2016; Bournelle e Beis, 2016; Agostini et al, 2020)

Além disso, diversos sistemas de neurotransmissão amplamente estudados em mamíferos já foram identificados e descritos em peixe-zebra, tais como: colinérgico, dopaminérgico, GABAérgico glutamatérgico, histaminérgico, serotoninérgico e purinérgico, ampliando o conhecimento sobre este modelo e contribuindo para sua utilização experimental (Kaslin; Panula, 2001; Behra et al, 2002; Edwards e Michel, 2002; Kucenas et al, 2003; Boehmler et al, 2004; Kim et al, 2004;; Rink e Guo, 2004; Rico et al, 2007; Rosemberg et al, 2010a; Savio et al, 2013; Vuaden et al, 2016).

1. 6 Justificativa

O aumento do consumo de álcool pela população é preocupante uma vez que esta substância é capaz de causar uma série de danos à saúde, bem como estabelecer o vício (Muller et al, 2017). Dessa forma, é de total importância elucidar os mecanismos biológicos e moleculares, além das consequências cognitivas e comportamentais relacionados ao uso do álcool, visto que ainda faltam lacunas a serem preenchidas para uma compreensão total sobre seus mecanismos de ação (Costardi et al, 2015).

Ao elucidar tais mecanismos, é possível caracterizar e descrever uma nova estratégia, para melhor compreender a complexidade da fisiopatologia celular e molecular envolvida em torno dos danos cerebrais relacionados ao consumo abusivo do etanol (Macrae e Peterson, 2015). Além disso, ainda merecem estudos científicos que visem o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que visem contribuir para a redução do impacto do consumo do etanol sobre o indivíduo, sua família e a sociedade como um todo (Lieschke e Currie, 2007).

Sendo o peixe-zebra um vertebrado suscetível a diferentes modelos de injúria cerebral, tais como a exposição a drogas de abuso, o presente estudo visa sua utilização como um modelo complementar para avaliar os efeitos neuroquímicos e comportamentais, envolvidos em diferentes danos cerebrais ocasionadas pelo álcool (Rico et al, 2011). Desta forma, nossos achados poderão permitir a futura compreensão dos eventos biológicos sobre uma nova perspectiva.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da exposição repetida ao álcool no comportamento relacionado à memória e na neurotransmissão mediada pela ACh e glutamato.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar se os peixes-zebra adultos previamente expostos ao modelo de Exposição Repetitiva ao Etanol (REE) apresentam alteração na capacidade de aquisição da memória de aprendizado.
- Determinar se os peixes-zebra adultos expostos a concentração padronizada de MK-801 apresentam alteração na capacidade de aquisição de memória de aprendizado.
- Avaliar parâmetros glutamatérgicos, tais como, atividade dos transportadores de glutamato e níveis de glutamato em cérebro de peixes-zebra adultos quando submetidos previamente ao modelo de REE.
- Avaliar parâmetros colinérgicos, tais como, atividade das enzimas responsáveis pela síntese (ChAT) e degradação (AChE) de acetilcolina em cérebro de peixes-zebra adultos quando submetidos previamente ao modelo de REE.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para o presente projeto, foram utilizados 184 peixes-zebra (*Danio rerio*) adultos, com aproximadamente quatro meses de idade, de linhagem heterogênea, do fenótipo short fin wild-type, com proporção de 50:50 para ambos os sexos. O Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) forneceu os animais, que foram mantidos no Laboratório de Neurologia Experimental, da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC).

Os peixes foram mantidos em aquários de 20 litros, contendo 30 animais por aquário. A água é proveniente do processo de osmose reversa e é salinizada e aerada regularmente, com temperatura de $28,5 \pm 1$ °C. O fotoperíodo é controlado em ciclos de claro-escuro (14h/10h), com as luzes acesas as 7h e apagadas as 21h e a alimentação é realizada duas vezes ao dia com ração flocada. A utilização dos animais seguiu o protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, tendo como número de protocolo 37/2020, deferido no dia 09/06/2020 (Anexo I).

3.2 Cálculo amostral e organização dos grupos experimentais

A média e o desvio padrão utilizados no cálculo do número amostral para este projeto foram baseados em estudos prévios. Visto que o objeto de estudo é material biológico, o qual há uma variabilidade maior entre os indivíduos, há a necessidade de um número adequado de tamanho amostral e desvio padrão, dependendo da variável estudada, para haver confiabilidade nos resultados e na significância das diferenças estatísticas.

O número mínimo de animais necessários para a avaliação da memória é considerado de 12 por grupo, conforme descrito previamente (Amorim et al, 2017). Estudos que realizam técnicas neuroquímicas em peixe-zebra utilizam N amostral entre 4 e 6 animais (Rico et al, 2010; Kalueff et al, 2012), sendo utilizado um pool cerebral de 1 a 3 animais por N amostral, dependendo das análises bioquímicas para neurotransmissão a serem feitas.

Para a quantificação dos níveis de glutamato e captação de glutamato, foi utilizado um pool de um cérebro por N. Para a atividade da enzima ChAT foi utilizado dois cérebros por n e para a enzima AChE, um

pool de três cérebros por N. Além disso, foi considerado uma estimativa de taxa de mortalidade de 20% para os animais que forem submetidos a exposição repetitiva ao etanol (REE), portanto, foram necessários para o presente estudo, um total de 184 animais.

3.3 Grupos

Neste trabalho, foi utilizado o protocolo de exposição repetitiva ao etanol (REE) juntamente com uma administração (i.p.) de MK-801 (10 μ L). Os animais foram escolhidos de forma aleatória para a formação dos grupos. Foram utilizados quatro grupos experimentais: o grupo controle, que não foi exposto ao álcool com a administração (i.p.) de PBS salina; o grupo controle + administração (i.p.) de MK-801, o grupo exposto ao álcool + administração (i.p.) de PBS salina; e o grupo exposto ao álcool + administração (i.p.) de de MK-801.

3.4 Desenho experimental

Durante oito dias, os animais foram expostos uma vez ao dia, durante 20 minutos ao etanol a 1% v/v. O mesmo procedimento foi feito com o grupo controle, porém, este não foi exposto ao etanol. No oitavo dia foi realizado o treino com o aparato da esquiiva inibitória. Os grupos MK-801 e REE+MK-801 receberam uma injeção intraperitoneal de MK-801 (2mg/kg) no último dia de exposição, logo após a realização do treino nos aparatos comportamentais. Antes de cada injeção i.p, os animais foram expostos em solução de tricaína (160 μ g/mL).

Os animais dos grupos Controle e REE (que não receberam a injeção de MK-801), receberam uma injeção intraperitoneal contendo 10 μ L de tampão-fosfato (PBS). As doses de MK-801 escolhidas para o presente projeto foram baseadas em estudos prévios que constataram a eficiência dessa dose no prejuízo da memória, porém, sem interferir em parâmetros locomotores (Herculano et al, 2015; Francescon et al, 2020). Posteriormente a realização das fases de teste nos aparatos comportamentais de esquiiva inibitória e reconhecimento de objeto, os animais foram anestesiados com tricaína (160 μ g/mL) antes de serem eutanasiados.

Após a eutanásia, foram dissecados os cérebros dos animais e coletados para a avaliação dos parâmetros neuroquímicos tais como, captação e níveis de glutamato, e da atividade das enzimas colina acetil transferase (ChAT) e (AChE) (Figura 2).

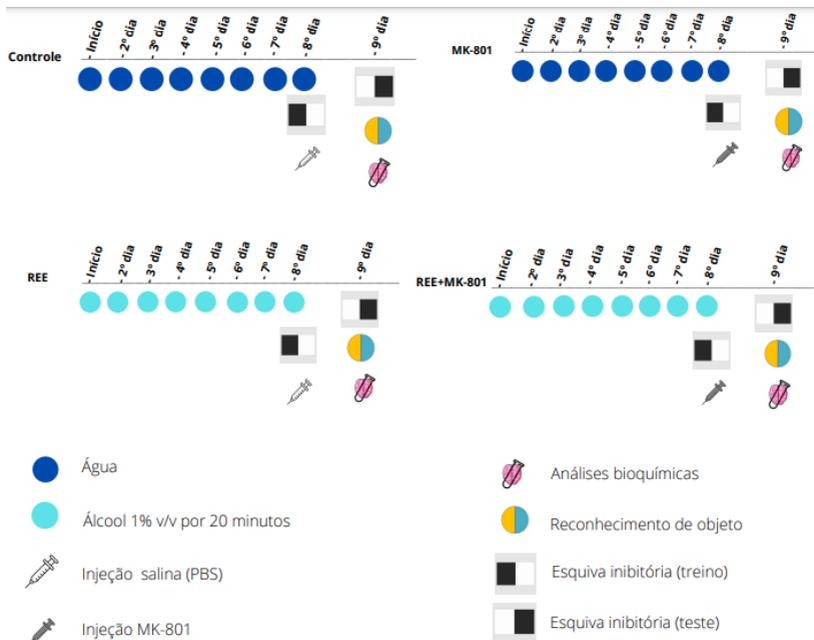


Figura 2: Delineamento experimental. Os animais foram expostos ao etanol por 20 minutos, uma vez ao dia, durante oito dias. Após o protocolo de exposição repetitiva ao etanol, foi realizado o treino da esquiva inibitória e a administração intraperitoneal de MK-801. 24 horas após a última exposição, foram realizados os testes comportamentais. Posteriormente, os animais foram eutanasiados para a retirada dos encéfalos a fim de realizar os ensaios neuroquímicos. Fonte: do autor (2021).

3.5 Testes comportamentais

3.5.1 Teste da esquiva inibitória

No oitavo dia de exposição, foi realizado o treino com o aparato da esquiva inibitória. Os animais foram colocados individualmente em um aquário com dimensões de 30x10x10cm, dividido ao meio por uma porta-guilhotina, contendo uma metade do aquário totalmente branca e a outra totalmente preta. No compartimento preto do aquário, são instalados eletrodos capazes de gerar descarga elétrica (Figura 3). O treino consiste

em colocar o peixe no aquário de treino, no compartimento branco do aquário, e aguardar um minuto para a aclimação do animal ao novo ambiente.

Após, a porta é aberta para que o animal possa chegar ao outro lado do aquário. Ao transpassar a porta, esta é fechada e uma descarga elétrica de 6V é aplicada durante cinco segundos. A seguir, os animais são recolocados em seus aquários-moradia. Imediatamente após o treino, o animal foi anestesiado através da exposição em triclaína (160 μ g/mL) por 30 segundos e recebeu injeção única de solução de tampão fosfato salina (PBS) ou MK-801 ip. Após 24 horas à realização do treino, ocorreu o teste, no qual o mesmo protocolo foi realizado, porém, nenhuma descarga elétrica é aplicada no momento em que o animal adentrar ao compartimento preto do aquário. Posteriormente aos testes, os animais foram anestesiados com triclaína (160 μ g/mL) antes de serem eutanasiados para a realização das análises neuroquímicas.

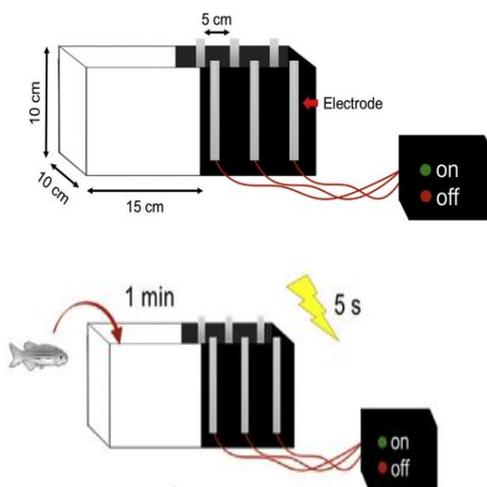


Figura 3: Aparato da Esquiva Inibitória. Os animais são colocados individualmente no compartimento branco do aparato e é aguardado o tempo de 1 minuto para a aclimação. Posteriormente, a porta de guilhotina é aberta, permitindo a passagem do animal para o compartimento preto. A porta é fechada e o animal recebe uma descarga elétrica de 6V durante 5 segundos. Durante a fase de teste, o mesmo protocolo é realizado, porém nenhuma descarga elétrica é aplicada no momento que o animal adentrar ao compartimento preto do aparato. Fonte: Bertancelo et al, 2019.

3.5.2 Teste de reconhecimento de objeto

Após oito dias do protocolo de exposição repetitiva ao etanol, os animais foram avaliados no teste de reconhecimento de objeto para verificar os parâmetros de memória espacial. O protocolo comportamental que foi utilizado, foi baseado em estudos prévios de Gaspary et al (2018). O aparato consiste em um aquário de vidro de dez litros, de dimensões 30 x 35 x 10 cm, preenchido com uma coluna de água de 6 cm. As paredes do aparato são externamente cobertas por plástico preto, a fim de evitar influências externas e o fundo do aquário é dividido por marcações em três regiões (dois quadrados idênticos onde os objetos estão localizados e a área sem objeto).

Os objetos utilizados são cubos de plástico não tóxico, com aproximadamente 4 centímetros, de cor azul ou amarelo. Antes do início do treino, os peixes foram habituados ao aparato experimental, na ausência de objetos, por cinco minutos, duas vezes ao dia, durante três dias consecutivos. No quarto dia, na fase de treino, os animais foram expostos a dois cubos idênticos (com a mesma cor) por 15 minutos. O tempo que o animal permanece em cada lado do aparato foi anotado e o tempo fora da área com os objetos foi determinado subtraindo os tempos dispendidos no objeto esquerdo e objeto direito. Após o treinamento, os animais foram submetidos a um intervalo de retenção de uma hora. No momento do teste, um objeto novo do mesmo formato, porém, com cor diferente, foi colocado no lugar de um dos objetos da fase de treino.

Dessa forma, o tempo de exploração de cada objeto foi avaliado por 15 minutos (Figura 4). Novamente o tempo fora das áreas com objetos foi determinado subtraindo os tempos dispendidos no objeto esquerdo e objeto direito. A área de exploração do objeto foi definida com uma marcação de 8 x 8 cm ao redor do objeto. Posteriormente aos testes, os animais foram anestesiados com tricafina (160µg/mL) antes de serem eutanasiados para a realização das análises neuroquímicas.

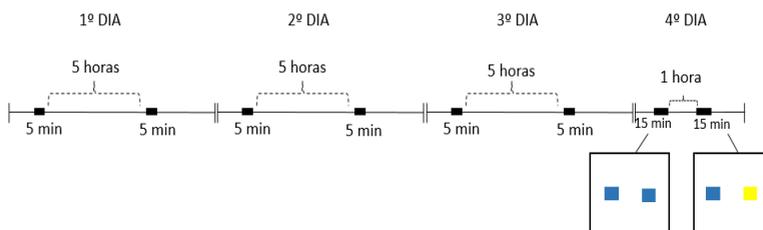


Figura 4: Protocolo de teste de Reconhecimento de Objeto. Os animais foram aclimatados ao aparato duas vezes ao dia, durante três dias. 24 horas após a última exposição ao etanol, foram realizados o treino e o teste. Na fase de treino, os animais são colocados no aparato contendo dois objetos idênticos, durante 15 minutos. Os tempos dispendidos em cada objeto é contabilizado. 1 hora após o treino, é realizado o teste, que consiste no mesmo protocolo do treino, porém um dos objetos é trocado por outro de cor diferente. Novamente, o tempo dispendido nos dois objetos é contabilizado para avaliação da capacidade de memória.

3.6 Parâmetros de avaliação do sistema glutamatérgico

3.6.1 Captação de glutamato

Para a realização deste ensaio neuroquímico, os peixes são anestesiados com tricaina e posteriormente eutanasiados por decapitação para extração do cérebro. O cérebro é acondicionado em placas de Petri umidificadas com a solução salina balanceada de Hank (tampão HBSS-HEPES [em mM: 137 NaCl; 0.63 Na₂HPO₄; 4.17 NaHCO₃; 5.36 KCl; 0.44 KH₂PO₄; 1.26 CaCl₂; 0.41 MgSO₄; 0.49 MgCl₂ e 1.11 glicose, pH 7.2.]), conforme descrito por Rico et al (2010).

Os cérebros são transferidos para placas de cultura de 24 poços contendo 0,5 mL de tampão HBSS-HEPES. As estruturas são acondicionadas de forma individual em cada poço da placa, sendo mantida em 37°C ao longo de todo ensaio. O ensaio de captação de glutamato foi realizado como descrito anteriormente (Rico et al, 2010; Zenki et al, 2014). A captação total de glutamato foi medida com a adição de 0,33 µCi mL⁻¹ de L-[³H] de glutamato ao meio de incubação a 37 °C por cintilação líquida.

Em todos os ensaios, a absorção de glutamato foi interrompida com duas lavagens subsequentes com o tampão HBSS-HEPES após um período de 7 min com duas lavagens subsequentes (300µL de tampão HBSS-HEPES). A captação de glutamato independente de Na⁺ foi medida usando as mesmas condições descritas acima, exceto o tampão que não terá sódio em sua composição. A captação de glutamato dependente de Na⁺ foi medida como a diferença da radioatividade incorporada entre a captação total de glutamato e a captação de glutamato independente de Na⁺. O conteúdo intracelular de L-[³H] de glutamato foi determinado por cintilação e a captação específica foi calculada.

3.6.2 Níveis de glutamato em CLAE

Para determinar os níveis de glutamato por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é utilizado o tecido cerebral total. As amostras são homogeneizadas em eppendorfs contendo 500 μ L de metanol. Posteriormente as amostras são centrifugadas a 12000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante é mantido em gelo por 5 minutos e segue para a realização da técnica de CLAE. O método cromatográfico que foi utilizado é baseado ao estudo de De Benedetto et al (2014) com adaptações.

A separação cromatográfica foi realizada com Coluna de fase reversa, Ascentis® C18 (250 mm x 2.1 mm 5 μ m; Supelco®, USA) e sistema cromatográfico composto por uma bomba de distribuição da fase móvel LC-20AT acoplada a um autosampler SIL20AHT e um detector de fluorescência RF-20A; Shimadzu (Kyoto, Japan), o software para aquisição de dados em cromatografia é o LCSolution. As amostras possuem o volume de injeção de 20 μ L, com temperatura de análise de 35 °C.

A taxa de bombeamento da fase móvel é de 0,3 mL/min. A detecção é realizada por fluorescência, monitorada nos comprimentos de onda de excitação em 279 nm e de emissão 320 nm. O perfil da fase móvel é isocrático: tampão acetato (pH 3.5, ácido acético 12 mM, 0.26 mM EDTA) e metanol (86:14, v/v). Os picos identificados foram quantificados por comparação do seu tempo de retenção na solução da amostra com a da solução padrão por meio de curva de calibração.

3.7 Parâmetros de avaliação do sistema colinérgico

3.7.1 Atividade de colina acetiltransferase (ChAT)

A atividade da enzima ChAT foi determinada conforme Chao e Wolfram (1973) em cérebro total. As amostras foram incubadas no meio de reação contendo tampão fosfato de sódio 0,5 M (pH 7,2), 6,2 mM de acetil-CoA, 1 M de cloreto de colina, 0,76 mM de sulfato de neostigmina 0,76 mM, 3 M de cloreto de sódio e 1,1 mM de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA).

Após, foi adicionado 1 mM de 4,4'-ditiodipiridina (4-PDS) e a leitura da absorvância foi feita a 324 nm por 20 minutos em um leitor de microplaca SpectraMax® (Molecular Devices® Califórnia,USA). A atividade foi medida pela formação do conjugado 4-tiopiridona (4-TP), produto resultante da ligação do CoA com o 4-PDS. Os resultados foram

calculados utilizando-se o coeficiente de extinção molar do 4-TP, $1,98 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, e estão expressos em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína⁻¹. A proteína total foi avaliada pelo método de Lowry et al. (1951).

3.7.2 Atividade de acetilcolinesterase (AChE)

A análise da atividade da enzima AChE foi realizada em cérebro total de acordo com o método descrito por Ellman e colaboradores (1961). A mistura de reação (volume final 2 mL) é composta por tampão fosfato de potássio 150 mM (pH 7,5) e ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) 10 mM. Posteriormente a enzima (10 µg de proteína) foi pré-incubada durante 3 minutos. A reação iniciará pela adição de 8 mM de iodeto de acetiltiocolina (AcSCh). Todas as amostras foram testadas em duplicata e a atividade enzimática foi expressa em µmol de AcSCh.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

3.8 Dosagem de proteínas

A quantificação de proteínas totais nas amostras foi realizada através do método de método Lowry et al. (1951) para as análises de captação de glutamato, níveis de glutamato, atividade da AChE e atividade da ChAT. Como padrão foi utilizado albumina sérica bovina.

3.9 Análises estatísticas

Os métodos estatísticos utilizados nos dados obtidos pelos diferentes ensaios bioquímicos e comportamentais foram determinados conforme as análises de normalidade dos dados. Para isso, a verificação da distribuição dos dados foi feita pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados distribuídos de forma normal foram analisados por meio da análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de múltiplas comparações de Tukey. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn. Para o teste de reconhecimento de objeto, foi utilizado o Teste-t de Student, segundo Gasparly, 2018. Foi considerado diferença estatística quando valor de $p \leq 0,05$. Os dados foram apresentados em médias e erro padrão da média ou em medianas e intervalo interquartil, dependendo da normalidade obtida.

4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros comportamentais

Para avaliar se a exposição repetitiva ao álcool gerou alterações de memória nos grupos experimentais, foram realizados testes comportamentais de memória. Os testes utilizados no presente estudo foram a esQUIVA inibitória e o teste de reconhecimento de objeto. No teste da esQUIVA inibitória, os parâmetros avaliados para determinar se houve alteração de memória foram: tempo de latência para a primeira entrada no compartimento preto do aparato durante a fase de teste, tempo de permanência no compartimento branco do aparato e tempo de permanência no compartimento preto do aparato. No teste de reconhecimento de objeto, o parâmetro avaliado foi o tempo gasto no objeto familiar e tempo gasto no objeto novo.

Durante o teste da esQUIVA inibitória foi observado diferenças significativas nos tempos de latência, tempo gasto na parte branca do aparato e tempo gasto na parte preta do aparato em todos os grupos, quando comparado ao controle ($p < 0,01$) (Figura 4). O tempo de latência e o tempo gasto no compartimento branco foi menor em todos os grupos quando comparado ao controle ($p < 0,05$) (Figura 4A, Figura 4B).

Além disso, o tempo gasto no compartimento preto do aparato foi maior em todos os grupos quando comparado ao controle ($p < 0,05$) (Figura 4C). No teste de reconhecimento de objeto, foi observado diferença significativa entre o tempo gasto no objeto familiar e o tempo gasto no objeto novo do grupo controle, apresentando um aumento de 42% na média de tempo entre o objeto novo e familiar ($p < 0,05$). Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas em relação aos parâmetros avaliados (Figura 5).

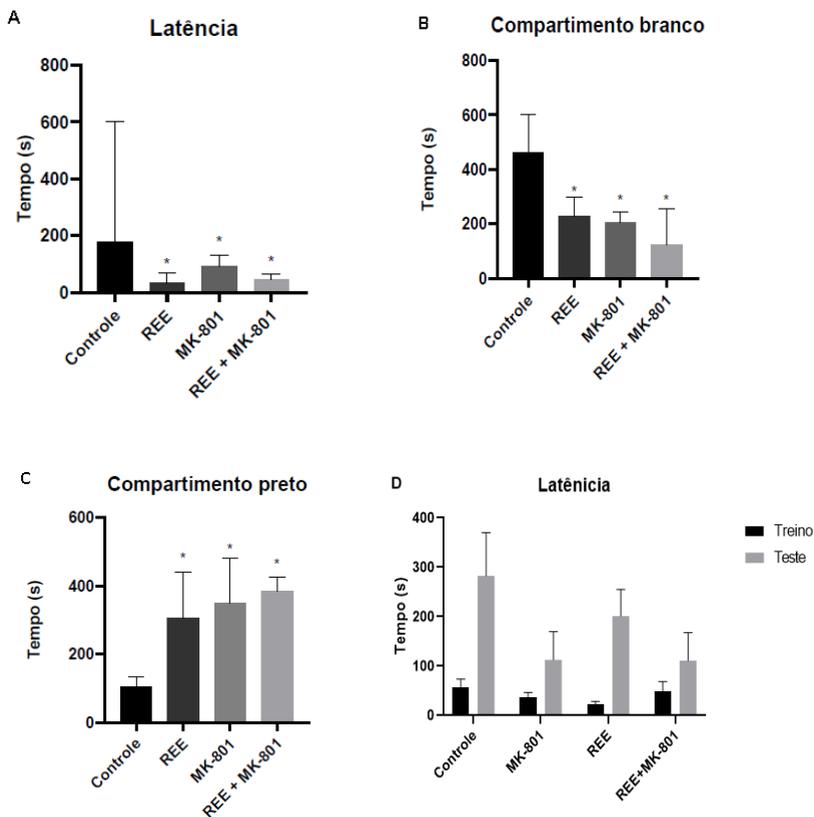


Figura 5: Avaliação do efeito da exposição repetitiva ao etanol nos grupos MK-801, REE e REE + MK801 sobre a capacidade de aquisição de memória frente à um estímulo aversivo no aparato de Esquiva Inibitória. Tempo de Latência para primeira entrada no compartimento preto do aparato (A). Tempo gasto no compartimento branco do aparato (B). Tempo gasto no compartimento preto do aparato (C). * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (Kuskal-Wallis seguido por post-hoc de Dunn).

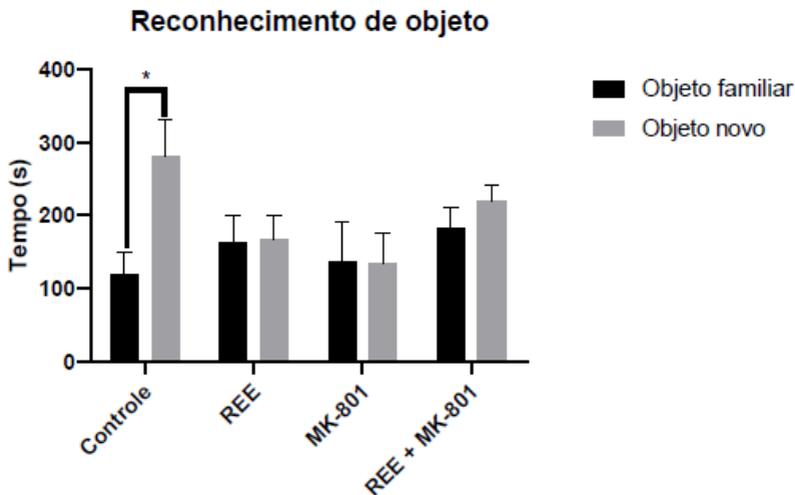


Figura 6: Avaliação do efeito da exposição repetitiva ao etanol nos grupos MK-801, REE e REE + MK801 sobre a capacidade de aquisição de memória no teste de Reconhecimento de Objeto. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (Teste-t de Student não pareado).

4.2 Parâmetros glutamatérgicos

Com o objetivo de comparar o comprometimento observado nos testes comportamentais de memória com parâmetros neuroquímicos cerebrais, foram quantificados os níveis de glutamato por CLAE e avaliada a captação total de glutamato em cérebro de peixe-zebra. A análise obtida através da CLAE, demonstrou que os níveis de glutamato foram significativamente reduzidos no grupo REE quando comparado ao controle e ao grupo MK-801 ($p > 0,05$) (Figura 6).

Da mesma forma, o grupo REE+MK-801 apresentou redução significativa dos níveis de glutamato quando comparado aos grupos controle e MK-801 ($p < 0,05$). Em relação à captação de glutamato, embora observado redução no grupo REE quando comparado ao controle, esta redução não se apresentou significativamente diferente ao serem realizados os testes estatísticos (Figura 7).

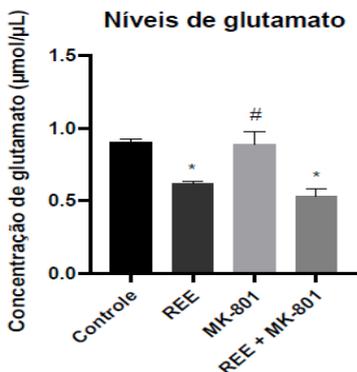


Figura 7: Avaliação dos níveis de glutamato em cérebro de peixe-zebra, por CLAE, após protocolo de exposição repetitiva ao etanol. Os valores estão expressos em concentrações de glutamato em ug/uL após o tempo necessário para a separação da amostra na coluna de fase fixa. Os resultados representam média \pm desvio padrão de 6 diferentes experimentos, cada um em duplicata. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle (ANOVA de uma via seguida por post-hoc de Tukey).

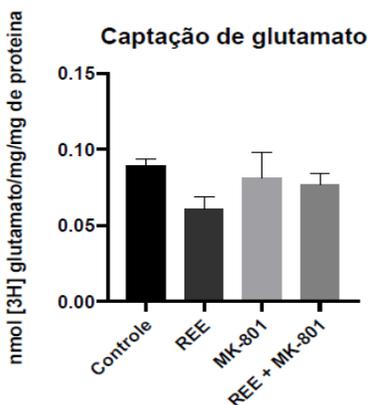


Figura 8: Avaliação da captação total de glutamato em cérebro de peixe-zebra, após protocolo de exposição repetitiva ao etanol. Os resultados representam média \pm desvio padrão de 6 diferentes experimentos, cada um em duplicata. (ANOVA de uma via seguida de post hoc de Tukey).

4.3 Parâmetros colinérgicos

A memória apresenta relações com o sistema glutamatérgico, porém, além disso, o sistema colinérgico faz parte de uma importante via para a os processos relacionados a memória. Desta forma, para verificar se a função dos neurônios colinérgicos foi influenciada após a exposição repetitiva ao etanol, foram avaliados os parâmetros colinérgicos através da atividade das enzimas que sintetizam (ChAT) e degradam (AChE) a ACh.

Foi observada uma redução significativa da atividade da ChAT do grupo REE+ MK-801 quando comparado ao controle ($p < 0,05$) (Figura 8a). Além disso, uma redução significativa também foi observada quando comparado o grupo MK-801 com o grupo REE+MK-801 ($p < 0,05$). A atividade da AChE também foi alterada significativamente no grupo REE, apresentando elevação quando comparada ao controle e ao grupo REE+MK-801 ($p < 0,05$) (Figura 8b).

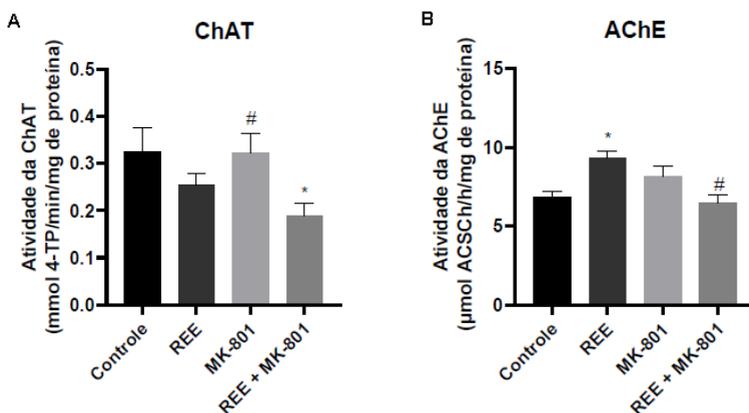


Figura 9: Efeito da exposição repetitiva ao etanol sobre a atividade das enzimas colinacetiltransferase (ChAT) (A) e acetilcolinesterase (AChE) (B) em cérebro total de peixe-zebra. Os resultados representam média \pm desvio padrão de 6 diferentes experimentos, cada um em duplicata. Os valores das atividades enzimáticas estão expressos em nmol 4-TP/min/mg de proteína e μ mol ACSh/h/mg de proteína respectivamente. $^*p < 0,05$ quando comparado ao controle. $^{\#}p < 0,05$ quando comparado ao grupo REE+MK-801 (ANOVA de uma via seguida de post hoc de Tukey).

5. DISCUSSÃO

O álcool, quando utilizado de forma repetitiva, tem demonstrado capacidade de gerar danos sobre diferentes mecanismos neurais, comportamentais e fisiológicos. Dentre as alterações comportamentais consequentes, estão alterações de memória, tanto durante a metabolização do etanol no organismo, quanto posteriormente à privação de seu uso. Inevitavelmente, tais alterações na memória estão correlacionadas com disfunções neuronais em alguns neurotransmissores, principalmente a ACh e o glutamato, que tem função importante na neurotransmissão excitatória necessária para a aquisição, formação e consolidação da memória (Floyd et al, 1997; Chefer et al, 2011).

Nesta dissertação, buscou-se avaliar os parâmetros comportamentais de memória e sua relação com os principais neurotransmissores associados, após o protocolo de exposição repetitiva ao etanol em peixe-zebra. Pôde-se observar, ao realizar o teste da esQUIVA inibitória, um comprometimento na aquisição de memória nos grupos expostos ao etanol (REE e REE+MK-801), quando comparado ao controle. O tempo de latência para a primeira entrada no compartimento preto do aparato durante a fase de teste, demonstra a capacidade de formação de memória dos animais avaliados. Como a memória aversiva é formada no compartimento preto do aparato durante a fase de treino, ao realizar o teste, espera-se que o modelo animal evite interagir com esta parte do aparato.

Como o tempo de latência do grupo REE foi significativamente reduzido quando comparado ao controle (Figura 4), pode-se sugerir que o estímulo aversivo não se consolidou em forma de memória. Além disso, o tempo de permanência observado no compartimento branco, local onde não foi promovido nenhum estímulo aversivo ao animal, mostrou-se significativamente menor no grupo exposto ao etanol. Do mesmo modo, o tempo no compartimento preto foi significativamente maior para o grupo exposto ao etanol quando comparado ao controle, corroborando com a observação de que houve comprometimento na aquisição da memória.

No teste de reconhecimento de objeto, espera-se que o animal que no processo de formação de memória normal, interaja por mais tempo com o objeto novo, em relação ao objeto familiar. Devido ao comportamento exploratório, o animal possui tendência em tentar identificar um novo estímulo visual quando já reconhece o antigo. Portanto, se o animal não dispender mais tempo no objeto novo em relação ao antigo, pode-se concluir que possui alteração na capacidade de

aquisição da memória àquele objeto, visto que não é reconhecido (Gaspary et al, 2018). No presente estudo, foi observado o padrão de dano cognitivo relacionado à memória nos grupos expostos ao álcool, pois os animais avaliados não interagiram significativamente com o objeto novo, quando comparado ao objeto familiar. Já o grupo controle, dispendeu significativamente mais tempo no objeto novo quando comparado ao objeto familiar, demonstrando aquisição da memória.

Além disso, o MK-801 foi capaz de gerar danos à memória, visto que os animais deste grupo não apresentaram capacidade de aprendizado nos dois testes realizados, corroborando com estudos anteriores (Bertoncelo, 2019; XIAO, 2019). Com os dois testes comportamentais de memória realizados, pode-se observar um prejuízo na aquisição de memória em peixe-zebra, seja relacionada a diferenças sutis em uma memória não aversiva (reconhecimento de objeto), ou relacionada a uma memória aversiva (Esquiva Inibitória).

Os processos relacionados à memória são complexos e envolvem diferentes fases, como aquisição, formação, consolidação e evocação (Provensi, 2018). Os dois testes comportamentais escolhidos para avaliação da memória no presente estudo, demonstram características distintas frente a capacidade de memória do animal, visto que a aquisição de memória é obtida a partir de estímulos diferentes. No presente estudo não é possível estabelecer quais fatores neurais estão atuando de forma específica em cada processo na criação de uma nova memória, no entanto, percebe-se que o etanol é capaz de interferir nestas diferentes etapas. Além disso, como as respostas biológicas dos grupos MK-801 e REE foram similares, fica evidente o dano à memória gerado pelo uso do álcool.

Ao avaliar os parâmetros neuroquímicos, foi possível expandir a compreensão sobre os mecanismos neurais associados ao comprometimento de memória observado. Com o objetivo de relacionar a sinalização colinérgica com os danos de memória observados no presente estudo, foram avaliadas as principais atividades enzimáticas responsáveis pela síntese e degradação da ACh.

A atividade da ChAT se apresentou significativamente reduzida no grupo REE quando comparada ao controle, podendo sugerir uma redução da síntese de ACh nos neurônios colinérgicos. A ativação de genes responsáveis pela codificação da enzima ChAT tem capacidade de restaurar as funções cognitivas cerebrais, demonstrando a importância da sinalização colinérgica para as funções de memória e aprendizado (Park et al, 2020).

Outro parâmetro importante para responsável pela regulação dos níveis de ACh na fenda sináptica, é a avaliação da AChE, enzima que degrada este neurotransmissor. A partir dos ensaios neuroquímicos realizados, foi observado um aumento significativo da atividade desta enzima no grupo REE, demonstrando uma maior degradação da ACh quando comparado ao grupo controle. O tempo de latência reduzido dos animais expostos ao álcool poderia estar relacionado a um mecanismo de excitabilidade exacerbada provocada pelo desequilíbrio entre os neurotransmissores inibitórios e excitatórios (De White, 2004). No entanto, considerando o conjunto dos achados que permitem observar uma redução da atividade enzimática nesses grupos, pode-se sugerir que os animais apresentaram comprometimento de memória nos testes comportamentais.

Visto que a ACh é um importante neurotransmissor relacionado aos mecanismos de formação da memória, tais resultados corroboram com os testes comportamentais realizados, pois uma menor disponibilidade de ACh na fenda sináptica pode alterar a sinalização neuronal desse sistema, influenciando na capacidade de aquisição da memória. Além disso, como o grupo MK-801 não demonstrou alterações na atividade da ChAT, porém, o grupo com a interação entre etanol e MK-801 sim, pode-se sugerir que a desregulação proporcionada à atividade desta enzima se dá apenas pela influência do etanol.

No grupo REE+MK801, foi observado uma menor síntese de ACh, porém, ao mesmo tempo, uma menor degradação desse neurotransmissor. Portanto, o estímulo neural ocasionado pela combinação do etanol e MK-801, pode ter ativado mecanismos de regulação da homeostase no cérebro dos animais avaliados (Von Bernhardt et al, 2017). Além disso, ao manter a atividade da AChE em níveis similares ao controle, a disponibilidade de colina que pode ser reutilizada para a síntese de novas moléculas de ACh continua constante.

No entanto, os resultados observados no grupo REE+MK-801 em relação a modulação da atividade das enzimas avaliadas, podem estar contribuindo para uma redução de ACh. Esta alteração na atividade destas enzimas marcadores da função colinérgica pode ser um dos mecanismos capaz de explicar os danos de memória observados nos testes comportamentais. Neste contexto, são necessários mais estudos que avaliem as interações farmacológicas e seus possíveis efeitos no cérebro.

A desregulação da atividade enzimática pode estar intimamente ligada com a metabolização do álcool e o estresse oxidativo gerado por essas vias metabólicas, como demonstrado em estudos anteriores (Niogales et al, 2014; Bernardo et al, 2019). A ativação das enzimas que

metabolizam o álcool (álcool desidrogenase, catalase, CYP2E1) pode levar à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), gerando dano celular que pode causar neuroinflamação. A susceptibilidade do cérebro frente a tais danos, pode ativar vias apoptóticas que interferem na homeostase cerebral, e como consequência, a sinalização neuronal é prejudicada (King et al, 2019). Além disso, a AChE é hiper-regulada pela ativação de fatores pró-inflamatórios, podendo explicar o aumento de sua atividade no grupo REE (Liu et al, 2020).

A ACh geralmente é alterada pelo consumo de etanol (Fadda e Rosetti, 1998; Stancampiano et al, 2004; Agostini et al, 2017; Bernardo et al, 2019). Além disso, estudos relacionam o prejuízo de memória com uma maior ativação da enzima responsável pela sua degradação (Acetilcolinesterase) e redução da enzima responsável pela sua síntese (Colina acetiltransferase), portanto, o presente estudo corrobora com estudos anteriores. (Rico et al, 2007; Agostini et al, 2018).

A colina, nutriente fundamental para um bom desenvolvimento cerebral, que participa na formação da membrana celular e é essencial para a síntese de ACh, tem seus níveis reduzidos pelo consumo de álcool (IOM, 1998; Biller et al, 2009). Essa relação pode ter influência na menor capacidade de aprendizado encontrada em indivíduos com quantidade reduzida de colina e ACh induzida pelo uso do etanol no presente estudo.

Além da ACh, o glutamato também tem importante função na sinalização neuronal excitatória responsável por processos de memória. Neste sentido, um dos objetivos desta dissertação, foi avaliar os níveis totais e a atividade dos transportadores de glutamato em cérebro de peixe-zebra. Os resultados obtidos a partir da determinação dos níveis de glutamato por CLAE, demonstraram que houve redução significativa dos níveis de glutamato nos grupos REE e REE+MK801 quando comparado ao controle. Além disso, após a avaliação, foi observado uma redução da captação de glutamato dependente de Na para o grupo REE, embora não tenha sido estatisticamente significativo. Esta desregulação da sinalização glutamatérgica, corrobora com os resultados obtidos a partir dos testes comportamentais de memória, onde os grupos expostos ao etanol apresentaram efeitos deletérios na aquisição da memória.

Uma possível explicação para a redução dos níveis de glutamato observada, pode ser devido a redução da expressão dos transportadores de glutamato (EAAT), já avaliada em outros estudos (Rothstein et al, 2005; Baggio et al, 2020). Também, visto que aproximadamente 80% da captação de glutamato é realizada pelos astrócitos, uma desregulação da capacidade de captação destas células gliais, pode estar envolvida na redução dos níveis de glutamato em cérebro de peixe-zebra exposto ao

etanol, embora não tenha sido avaliada a função glutamatérgica em tipos celulares específicos no presente estudo.

Além disso, disfunções duradouras no desenvolvimento de células gliais, relacionadas ao uso do álcool, já foram observadas anteriormente (Chatterjee et al, 2019). Da mesma forma, os astrócitos são capazes de regular a homeostase de glutamato no SNC por controlar sua liberação e recepção, podendo explicar as quantidades normais de captação de glutamato encontrada nos grupos avaliados (Mahmoud et al, 2019).

Importantemente, após a captação de glutamato realizada pelos astrócitos, a atividade enzimática da glutamina sintetase (GS) tem papel fundamental para manter a disponibilidade de glutamato no neurônio pré-sináptico. Portanto, alterações na atividade desta enzima pode comprometer a homeostase glutamatérgica por desregular o ciclo de formação, disponibilidade e recepção de glutamato (Baggio et al, 2020; Goodwani, 2017; Tiburcio-Félix et al, 2018). Contudo, a ativação do sistema glutamatérgico pode estar relacionado a outras vias de neurotransmissores, como os histaminérgicos, demonstrando uma interconexão de vias neurais que podem explicar a captação de glutamato em níveis normais observada no presente estudo (Yin et al, 2019).

Ademais, o bloqueio dos receptores NMDA é capaz de regular a atividade de neurotransmissores inibitórios, que podem ser compensados pela ativação complementar dos neurônios excitatórios, mediada também por outros receptores de glutamato (AMPA, cainato e metabotrópicos), mantendo o transporte de glutamato em níveis normais (Poleszak et al, 2013). Tais eventos podem explicar os resultados similares ao controle, observados do grupo MK-801. O acúmulo de glutamato na fenda sináptica e a consequente ativação exacerbada dos receptores, pode induzir a ativação transcricional de outros receptores de glutamato, e assim, o transporte desse neurotransmissor pode ser regulado a níveis normais (Canela et al, 2012). Neste contexto ao realizar o bloqueio dos receptores NMDA, é possível que estes processos estejam influenciando nos resultados similares ao controle observado no grupo MK-801.

O papel da sinalização neuronal mediada por canais de cálcio no transporte glutamatérgico possui um papel importante na expressão gênica. O influxo de cálcio ativado por receptores NMDA é responsável por regular diversas cascatas transcricionais iniciadas a partir desta ativação, controlando a expressão de genes envolvidos na plasticidade sináptica. Além disso, alterações na sinalização por cálcio via receptores NMDA está associada ao silenciamento de exons que transcrevem as

proteínas estruturais de tais receptores, podendo explicar as diferenças encontradas nos níveis de glutamato entre os grupos (Puri, 2020).

Os receptores NMDA tem importante papel na indução da potencialização de longa duração (LTP), responsável pela criação de vias sinápticas duradouras, e assim, formar novas memórias. Além disso, sabe-se que os processos de formação de LTP são regulados pelas LTDs, em um processo de retroalimentação pela atividade dos receptores nos neurônios pós-sinápticos. Da mesma forma, a inibição dos receptores NMDA por antagonistas, pode induzir a depressão de longa duração (LTD), impedindo a formação de memórias (Taniike et al, 2008; Volianskis et al, 2015).

O comprometimento da capacidade de formação de LTPs em peixe-zebra através da inibição dos receptores ionotrópicos de glutamato, foi verificado em um estudo (NAM et al, 2004). A formação de LTP é fundamental para a manutenção da plasticidade sináptica de longa duração, devido as cascatas intracelulares promovidas pelo influxo de cálcio durante a despolarização dos neurônios. Além disso, a partir destes mecanismos, a inibição de LTPs pode reduzir a capacidade fosforilativa de proteínas quinases, alterando o ciclo celular após a síntese proteica (Malenka, 1999; Morgane Teyler, 2001; Nicoll, 2017).

Portanto, sugere-se que os eventos observados no presente estudo frente as alterações neuroquímicas e comportamentais, podem ter influência da desregulação dos processos relacionados à formação de LTPs, induzidas pelo uso do álcool.

Estudos demonstraram a relação da exposição aguda ao álcool com a redução de LTP em ratos, através ativação glial de vias pró-inflamatórias (Hernandez et al, 2016; Gruol et al, 2020). Visto que a neurotransmissão glutamatérgica é fundamental para a ativação de LTPs, e no presente estudo, houve uma redução dos níveis de glutamato observado no grupo REE, pode-se sugerir que as respostas neuronais consequentes da exposição ao etanol são responsáveis pela redução da capacidade de memória encontrada neste grupo.

O álcool pode induzir déficits cognitivos também através da modulação da plasticidade sináptica, mediada principalmente por alterações epigenéticas, interferindo na sinalização sináptica (Lussier et al, 2017; Chastain e Sarkar, 2017). A deacetilação de histonas vem sendo documentada como um fator influenciador da manutenção da plasticidade sináptica e consequentemente, da capacidade cognitiva associada ao uso do álcool (Ramirez-Roman et al, 2018; Montagu-Romero et al, 2019; Shivakumar et al, 2020). As histonas deacetilases (HDAC) tem capacidade de desregular a expressão gênica, fundamental nos processos

de longo prazo para a formação de memórias (Lavenson et al, 2004; Stefanko et al, 2009).

Um estudo avaliou a relação entre o uso do álcool, a ativação das HDAC e a modulação da expressão gênica de subunidades dos NMDAR, demonstrando prejuízo cognitivo por desregular as LTDs (Drissl et al, 2019). Por outro lado, a inibição da atividade dessas enzimas e a melhoraram a capacidade cognitiva de formação de memória de curto e longo prazo em testes de reconhecimento de objeto utilizando o peixe-zebra (Faillace et al, 2017). Portanto, os efeitos provocados pela ação epigenética do uso álcool pode ajudar na explicação de parte dos processos que comprometem a memória, como observados no presente estudo.

Embora o grupo MK-801 tenha apresentado captação e níveis normais de glutamato, a LTD induzida pelo antagonismo dos NMDAR pode explicar as falhas de memória observada neste grupo nos testes comportamentais. Após a fase de treino nos aparatos comportamentais, o bloqueio dos NMDAR estimulado pela administração de MK-801, pode ter impedido a criação de LTP, essencial para a formação da memória. Dessa forma, não há a formação de uma nova via neural proporcionada por sinapses químicas eficientes, e portanto, o animal é incapaz de evocar a memória posteriormente (Nicoll, 2017).

Importantemente, um estudo demonstrou que o MK-801 inibe apenas parcialmente os canais iônicos dos receptores NMDA, permitindo o transporte glutamatérgico de forma reduzida por estes receptores. Além disso, as falhas de memória em ratos tratados com MK-801, não estão apenas relacionadas com o bloqueio dos receptores NMDA, podendo estar ligada à outras vias excitatórias desorganizadas em diferentes partes cerebrais, iniciadas pela inibição dos NMDAR (Sokolenko et al, 2020).

Outra explicação para os resultados neuroquímicos inalterados encontrados no grupo MK-801, se dá pelo protocolo utilizado no presente estudo, uma vez que a administração de MK-801 foi realizada imediatamente após o treino, impedindo a aquisição da memória nesta fase da avaliação comportamental. No entanto, como os animais foram eutanasiados 24h após a injeção, é possível que a interação farmacodinâmica já não pudesse mais ser detectada, e assim, a atividade dos neurotransmissores retornaram ao normal, similarmente ao controle.

Os níveis de glutamato dos grupos expostos ao etanol (REE e REE+MK-801) se apresentaram similares no presente estudo, porém, o grupo MK-801 apresentou similaridade com o controle. Dessa forma, é plausível afirmar que os efeitos observados neste parâmetro

glutamatérgico no grupo REE+MK-801, se deve apenas à ação do etanol no cérebro dos animais avaliados.

Visto que a resposta cognitiva em relação a atuação do álcool e do MK-801 no SNC é complexa e envolve circuitos de outros neurotransmissores, como os dopaminérgicos e gabaérgicos, as falhas de memória observadas podem estar relacionadas de forma indireta ao desequilíbrio dos neurotransmissores avaliados no presente estudo (Tran e Gerlai, 2013; Alexandre et al, 2019). Portanto, estudos envolvendo a interação entre os sistemas de sinalização química, juntamente à associação do etanol com fármacos, é necessária para uma maior compreensão dos eventos neurocomportamentais envolvidos a estes estímulos.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que o modelo de exposição repetitiva ao etanol foi capaz de promover dano à aquisição de memória, nos dois testes comportamentais realizados, e gerar alterações neuroquímicas nos sistemas colinérgico e glutamatérgico. Especificamente, a atividade das enzimas ChAT e AChE, além dos níveis de glutamato, sofreram alteração significativa pela ação do etanol. Sugere-se que os efeitos deletérios provocados à memória estão relacionados às alterações na sinalização neural excitatória dos neurotransmissores avaliados. Além disso, a administração de um antagonista não competitivo dos receptores NMDA (MK-801) prejudicou a aquisição da memória, porém, sem demonstrar alterações nos parâmetros de neurotransmissão avaliados, sugerindo uma ação farmacológica indireta para as respostas comportamentais. Os achados neste estudo evidenciam a importância dos efeitos nocivos do etanol sobre o cérebro no modelo que mimetiza o comportamento de uso repetitivo do álcool.

7 REFERÊNCIAS

Agostini JF, Costa NLF, Bernardo HT, Baldin SL, Mendes NV, de Pieri Pickler K, et al. Ceftriaxone Attenuated Anxiety-Like Behavior and Enhanced Brain Glutamate Transport in Zebrafish Subjected to Alcohol Withdrawal [Internet]. Vol. 45, *Neurochemical Research*. Springer Science and Business Media LLC; 2020. p. 1526–35.

Agostini JF, Toé HCZD, Vieira KM, Baldin SL, Costa NLF, Cruz CU, et al. Cholinergic System and Oxidative Stress Changes in the Brain of a Zebrafish Model Chronically Exposed to Ethanol [Internet]. Vol. 33, *Neurotoxicity Research*. Springer Science and Business Media LLC; 2017. p. 749–58.

Alexandre MCM, Mendes NV, Torres CA, Baldin SL, Bernardo HT, Scussel R, et al. Weekly ethanol exposure alters dopaminergic parameters in zebrafish brain [Internet]. Vol. 75, *Neurotoxicology and Teratology*. Elsevier BV; 2019. p. 106822.

Alsop, D. Wood, CM. Metal uptake and acute toxicity in zebrafish: Common mechanisms across multiple metals. *Aquatic Toxicology*, v. 105, n. 3–4, p. 385–393, out. 2011.

Amorim, RR Silva, PF. Luchiari, AC. Effects of Alcohol on Inhibitory Avoidance Learning in Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*, v. 14, n. 5, p. 430–437, out. 2017.

Balin, B, Abrams, JT, Schrogie, J. Toward a Unifying Hypothesis in the Development of Alzheimer’s Disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, v. 17, n. 6, p. 587–589, 24 nov. 2011.

Barbazuk, WB. The Syntenic Relationship of the Zebrafish and Human Genomes. *Genome Research*, v. 10, n. 9, p. 1351–1358, 1 set. 2000.

Behra M, Cousin X, Bertrand C, Vonesch J-L, Biellmann D, Chatonnet A, et al. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo [Internet]. Vol. 5, *Nature Neuroscience*. Springer Science and Business Media LLC; 2002. p. 111–8.

Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilacqua LRM, Izquierdo I, Medina JH. Persistence of Long-Term Memory Storage Requires a Late Protein Synthesis- and BDNF- Dependent Phase in the Hippocampus [Internet]. Vol. 53, *Neuron*. Elsevier BV; 2007. p. 261–77.

Bertoncello KT, Müller TE, Fontana BD, Franscescon F, Filho GLB, Rosemberg DB. Taurine prevents memory consolidation deficits in a novel alcohol-induced blackout model in zebrafish [Internet]. Vol. 93, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. Elsevier BV; 2019. p. 39–45.

Bianchin M, Mello e Souza T, Medina JH, Izquierdo I. The Amygdala Is Involved in the Modulation of Long-Term Memory, but Not in Working or Short-Term Memory [Internet]. Vol. 71, *Neurobiology of Learning and Memory*. Elsevier BV; 1999. p. 127–31.

Bird CW, Barber MJ, Post HR, Jacquez B, Chavez GJ, Fatusos NG, et al. Neonatal ethanol exposure triggers apoptosis in the murine retrosplenial cortex: Role of inhibition of NMDA receptor-driven action potential firing [Internet]. Vol. 162, *Neuropharmacology*. Elsevier BV; 2020. p. 107837.

Blank M, Guerim LD, Cordeiro RF, Vianna MRM. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: Rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory [Internet]. Vol. 92, *Neurobiology of Learning and Memory*. Elsevier BV; 2009. p. 529–34.

Boccia MM, Blake MG, Baratti CM, McGaugh JL. Involvement of the basolateral amygdala in muscarinic cholinergic modulation of extinction memory consolidation [Internet]. Vol. 91, *Neurobiology of Learning and Memory*. Elsevier BV; 2009. p. 93–7.

Boehmler W, Obrecht-Pflumio S, Canfield V, Thisse C, Thisse B, Levenson R. Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish [Internet]. Vol. 230, *Developmental Dynamics*. Wiley; 2004. p. 481–93.

Bournele D, Beis D. Zebrafish models of cardiovascular disease [Internet]. Vol. 21, *Heart Failure Reviews*. Springer Science and Business Media LLC; 2016. p. 803–13.

Bracco L, Bessi V, Padiglioni S, Marini S, Pepeu G. Do Cholinesterase Inhibitors Act Primarily on Attention Deficit? A Naturalistic Study in Alzheimer's Disease Patients. *JAD* [Internet]. 2014 abr 23;40(3):737–42.

Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.

Broughton, RE.; Milam, JE.; Roe, BA. The Complete Sequence of the Zebrafish (*Danio rerio*) Mitochondrial Genome and Evolutionary Patterns in Vertebrate Mitochondrial DNA. *Genome Research*, v. 11, n. 11, p. 1958–1967, 15 out. 2001.

Canela, L., Selga, E., García-Martínez, J. M., Amaral, O. B., Fernández-Dueñas, V., Alberch, J., ... Ciruela, F. (2012). Transcriptional profiling of striatal neurons in response to single or concurrent activation of dopamine D2, adenosine A2A and metabotropic glutamate type 5 receptors: Focus on beta-synuclein expression. *Gene*, 508(2), 199–205.

Chao, LP.; Wolfgram, F. Purification and some properties of choline acetyltransferase (EC 2.3.1.6) from bovine brain. *Journal of Neurochemistry*, v. 20, n. 4, p. 1075–1081, abr. 1973.

Chastain LG, Sarkar DK. Alcohol effects on the epigenome in the germline: role in the inheritance of alcohol-related pathology. *Alcohol*. 2017. 60:53-66.

Chauhan PS, Misra UK, Kalita J, Chandravanshi LP, Khanna VK. Memory and learning seems to be related to cholinergic dysfunction in the JE rat model [Internet]. Vol. 156, *Physiology & Behavior*. Elsevier BV; 2016. p. 148–55.

Costardi JVV, Nampo RAT, Silva GL, Ribeiro MAF, Stella HJ, Stella MB, et al. A review on alcohol: from the central action mechanism to chemical dependency [Internet]. Vol. 61, *Revista da Associação Médica Brasileira*. FapUNIFESP (SciELO); 2015. p. 381–7.

Cummings, KA.; Clem, RL. Prefrontal somatostatin interneurons encode fear memory. *Nature Neuroscience*, v. 23, n. 1, p. 61–74, 16 dez. 2019.

Dannenhoffer, CA.; Varlinskaya, EI.; Spear, LP. Effects of AMPA receptor antagonist, NBQX, and extrasynaptic GABAA agonist, THIP, on social behavior of adolescent and adult rats. *Physiology & Behavior*, v. 194, p. 212–217, out. 2018.

De Benedetto GE, Fico D, Pennetta A, Malitesta C, Nicolardi G, Lofrumento DD, et al. A rapid and simple method for the determination of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, norepinephrine, dopamine, and serotonin in mouse brain homogenate by HPLC with fluorimetric detection [Internet]. Vol. 98, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Elsevier BV; 2014. p. 266–70.

De Witte, P. Imbalance between neuroexcitatory and neuroinhibitory amino acids causes craving for ethanol. *Addictive Behaviors*, v. 29, n. 7, p. 1325–1339, set. 2004.

Drissi, I., Deschamps, C., Fouquet, G., Alary, R., Peineau, S., Gosset, P., ... Pierrefiche, O. (2019). Memory and plasticity impairment after binge drinking in adolescent rat hippocampus: GluN2A / GluN2B NMDA receptor subunits imbalance through HDAC2. *Addiction Biology*, e12760.

Ebarasi L, Oddsson A, Hultenby K, Betsholtz C, Tryggvason K. Zebrafish: a model system for the study of vertebrate renal development, function, and pathophysiology [Internet]. Vol. 20, *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health); 2011. p. 416–24.

Edwards, JG, Michel, WC. Odor-stimulated glutamatergic neurotransmission in the zebrafish olfactory bulb. *The Journal of Comparative Neurology*, v. 454, n. 3, p. 294–309, 19 nov. 2002.

Ellman GL, Courtney KD, Andres V jr, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity [Internet]. Vol. 7, *Biochemical Pharmacology*. Elsevier BV; 1961. p. 88–95.

Faillace, M., Pisera-Fuster, A., Medrano, M., Bejarano, A., & Bernabeu, R. (2017). Short- and long-term effects of nicotine and the histone deacetylase inhibitor phenylbutyrate on novel object recognition in zebrafish. *Psychopharmacology*, 234(6), 943–955.

Ferreira-Vieira T, M. Guimaraes I, R. Silva F, M. Ribeiro F. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System [Internet]. Vol. 14, Current Neuropharmacology. Bentham Science Publishers Ltd.; 2016. p. 101–15.

Floyd EA, Young-Seigler AC, Ford BD, Reasor JD, Moore EL, Townsel JG, et al. Chronic ethanol ingestion produces cholinergic hypofunction in rat brain [Internet]. Vol. 14, Alcohol. Elsevier BV; 1997. p. 93–8.

Franscescon F, Müller TE, Bertoncetto KT, Rosemberg DB. Neuroprotective role of taurine on MK-801-induced memory impairment and hyperlocomotion in zebrafish [Internet]. Vol. 135, Neurochemistry International. Elsevier BV; 2020. p. 104710.

Froehlicher M, Liedtke A, Groh KJ, Neuhauss SCF, Segner H, Eggen RIL. Zebrafish (*Danio rerio*) neuromast: Promising biological endpoint linking developmental and toxicological studies [Internet]. Vol. 95, Aquatic Toxicology. Elsevier BV; 2009. p. 307–19.

Gerlai, R, Lee, V, Blaser, R. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 85, n. 4, p. 752–761, dez. 2006.

Gigliotti, A, Bessa, MA. Síndrome de Dependência do Álcool: critérios diagnósticos. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 26, n. suppl 1, p. 11–13, maio 2004.

Goldsmith, DJ. *Communicating Social Support* Cambridge University Press, 4 out. 2004.

Goodwani, S., Saternos, H., Alasmari, F., & Sari, Y. (2017). Metabotropic and ionotropic glutamate receptors as potential targets for the treatment of alcohol use disorder. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 77, 14–31.

Gruol, DL., Hernandez, RV., & Roberts, A. (2020). Alcohol Enhances Responses to High Frequency Stimulation in Hippocampus from Transgenic Mice with Increased Astrocyte Expression of IL-6. *Cellular and Molecular Neurobiology*.

Guo, S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes, Brain and Behavior*, v. 3, n. 2, p. 63–74, abr. 2004.

Guzmán-Vélez E, Warren DE, Feinstein JS, Bruss J, Tranel D. Dissociable contributions of amygdala and hippocampus to emotion and memory in patients with Alzheimer's disease [Internet]. Vol. 26, *Hippocampus*. Wiley; 2015. p. 727–38.

Herculano AM, Puty B, Miranda V, Lima MG, Maximino C. Interactions between serotonin and glutamate–nitric oxide pathways in zebrafish scototaxis [Internet]. Vol. 129, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. Elsevier BV; 2015. p. 97–104.

Hernandez RV, Puro AC, Manos JC, Huitron-Resendiz S, Reyes KC, Liu K, Vo K, Roberts AJ, Gruol DL (2016) Transgenic mice with increased astrocyte expression of IL-6 show altered effects of acute ethanol on synaptic function. *Neuropharmacology* 103:27–43.

Holcombe A, Howorko A, Powell RA, Schalomon M, Hamilton TJ. Reversed Scototaxis during Withdrawal after Daily-Moderate, but Not Weekly-Binge, Administration of Ethanol in Zebrafish [Internet]. Kalueff AV, organizador. Vol. 8, *PLoS ONE*. Public Library of Science (PLoS); 2013. p. e63319.

Izquierdo I, Medina JH, Vianna MRM, Izquierdo LA, Barros DM. Separate mechanisms for short- and long-term memory [Internet]. Vol. 103, *Behavioural Brain Research*. Elsevier BV; 1999. p. 1–11.

Izquierdo, I.; Furini, C. R. G.; Myskiw, J. C. Fear Memory. *Physiological Reviews*, v. 96, n. 2, p. 695–750, abr. 2016.

Izquierdo, Ivan. *Memória-3*. Artmed Editora, 2018.

Kalueff AV, Gebhardt M, Stewart AM, Cachat JM, Brimmer M, Chawla JS, et al. Towards a Comprehensive Catalog of Zebrafish Behavior 1.0 and Beyond [Internet]. Vol. 10, *Zebrafish*. Mary Ann Liebert Inc; 2013. p. 70–86.

Kaslin, J.; Panula, P. Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *The Journal of Comparative Neurology*, v. 440, n. 4, p. 342–377, 2001.

Khan KM, Collier AD, Meshalkina DA, Kysil EV, Khatsko SL, Kolesnikova T, et al. Zebrafish models in neuropsychopharmacology and CNS drug discovery [Internet]. Vol. 174, *British Journal of Pharmacology*. Wiley; 2017. p. 1925–44.

Kim JH, Lee S-R, Li L-H, Park H-J, Park J-H, Lee KY, et al. High Cleavage Efficiency of a 2A Peptide Derived from Porcine Teschovirus-1 in Human Cell Lines, Zebrafish and Mice [Internet]. Thiel V, organizador. Vol. 6, *PLoS ONE*. Public Library of Science (PLoS); 2011. p. e18556.

Koob, GF, Volkow, ND. Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology*, v. 35, n. 1, p. 217–238, 26 ago. 2009.

Kucenas S, Li Z, Cox JA, Egan TM, Voigt MM. Molecular characterization of the zebrafish P2X receptor subunit gene family [Internet]. Vol. 121, *Neuroscience*. Elsevier BV; 2003. p. 935–45.

Lee, H, Roh, S, Kim, D. J. Alcohol-Induced Blackout. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 6, n. 11, p. 2783–2792, 6 nov. 2009.

Lele, Z, Krone, PH. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnology Advances*, v. 14, n. 1, p. 57–72, jan. 1996.

Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD. Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *J Biol Chem*. 2004;279(39):40545-40559

Lieschke, GJ.; Currie, PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*, v. 8, n. 5, p. 353–367, maio 2007.

Liu C, Tian X, Ling Y, Xu J, Zhou X. Alterations of Metabolites in the Frontal Cortex and Amygdala Are Associated With Cognitive

Impairment in Alcohol Dependent Patients With Aggressive Behavior [Internet]. Vol. 11, *Frontiers in Psychiatry*. Frontiers Media SA; 2020.

Liu EYL, Xia Y, Kong X, Guo MSS, Yu AXD, Zheng BZY, et al. Interacting with 7 nAChR is a new mechanism for AChE to enhance the inflammatory response in macrophages [Internet]. Vol. 10, *Acta Pharmaceutica Sinica B*. Elsevier BV; 2020. p. 1926–42.

Lucas-Meunier E, Fossier P, Baux G, Amar M. Cholinergic modulation of the cortical neuronal network [Internet]. Vol. 446, *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. Springer Science and Business Media LLC; 2003. p. 17–29.

Lussier AA, Weinberg J, Kobor MS. Epigenetics studies of fetal alcohol spectrum disorder: where are we now? *Epigenomics*. 2017;9(3):291-311.

Macrae, CA, Peterson, RT. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 14, n. 10, p. 721–731, 11 set. 2015.

Mahmoud, S, Gharagozloo, M, Simard, C, & Gris, D. (2019). Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. *Cells*, 8(2), 184.

Malenka, R. C. (1999). Long-Term Potentiation--A Decade of Progress? *Science*, 285(5435), 1870–1874.

Mameli, M. Neurosteroid-Induced Plasticity of Immature Synapses via Retrograde Modulation of Presynaptic NMDA Receptors. *Journal of Neuroscience*, v. 25, n. 9, p. 2285–2294, 2 mar. 2005.

McGovern PE. *Uncorking the past: the quest for wine, beer, and other alcoholic beverages*. University of California Press, Berkley, 2009.

Mira RG, Lira M, Tapia-Rojas C, Rebolledo DL, Quintanilla RA, Cerpa W. Effect of Alcohol on Hippocampal-Dependent Plasticity and Behavior: Role of Glutamatergic Synaptic Transmission [Internet]. Vol. 13, *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. Frontiers Media SA; 2020.

Montagud-Romero S, Cantacorps L, Valverde O. Histone deacetylases inhibitor trichostatin A reverses anxiety-like symptoms and memory impairments induced by maternal binge alcohol drinking in mice

[Internet]. Vol. 33, Journal of Psychopharmacology. SAGE Publications; 2019. p. 1573–87.

Morgan, SL, Teyler, TJ. Epileptic-like activity induces multiple forms of plasticity in hippocampal area CA1. *Brain Research*, 917(1), 2001. p. 90–96.

Müller CP, Kalinichenko LS, Tiesel J, Witt M, Stöckl T, Sprenger E, et al. Paradoxical antidepressant effects of alcohol are related to acid sphingomyelinase and its control of sphingolipid homeostasis [Internet]. Vol. 133, *Acta Neuropathologica*. Springer Science and Business Media LLC; 2016. p. 463–83.

Nam, RH, Kim, W, Lee, CJ. NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the telencephalon of the zebrafish. *Neuroscience Letters*, 370(2-3), 2004. p. 248–251.

Newman MB, Nazian SJ, Sanberg PR, Diamond DM, Shytle RD. Corticosterone-attenuating and anxiolytic properties of mecamylamine in the rat [Internet]. Vol. 25, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. Elsevier BV; 2001. p. 609–20.

Ng M-C, Hsu C-P, Wu Y-J, Wu S-Y, Yang Y-L, Lu K-T. Effect of MK-801-induced impairment of inhibitory avoidance learning in zebrafish via inactivation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in telencephalon [Internet]. Vol. 38, *Fish Physiology and Biochemistry*. Springer Science and Business Media LLC; 2012. p. 1099–106.

Nicoll, RA. A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron*, 93(2), 2017. p. 281–290.

Park, D, Choi, EK, Cho, TH, Joo, SS, Kim, YB. Human Neural Stem Cells Encoding ChAT Gene Restore Cognitive Function via Acetylcholine Synthesis, A β Elimination, and Neuroregeneration in APP^{swe}/PS1^{dE9} Mice. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 3958.

Plomin, R, DeFries, JC, Craig, IW., McGuffin, P. (2003). *Behavioral genetics*. Artmed Editora, 2016.

Poleszak, E, Serefko, A, Szopa, A, Wośko, S, Dudka, J, Wróbel, A. ... Wlaź, P. NMDA receptor activation antagonizes the NMDA antagonist-

induced antianxiety effect in the elevated plus-maze test in mice. *Pharmacological Reports*, 65(5), 2013. p. 1124–1131.

Provensi G, Costa A, Izquierdo I, Blandina P, Passani MB. Brain histamine modulates recognition memory: possible implications in major cognitive disorders [Internet]. Vol. 177, *British Journal of Pharmacology*. Wiley; 2018. p. 539–56.

Puri BK. (2020) Calcium Signaling and Gene Expression. In: Islam M. (eds) *Calcium Signaling. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1131. Springer, Cham.

Quinlan EM, Philpot BD, Huganir RL, Bear MF. Rapid, experience-dependent expression of synaptic NMDA receptors in visual cortex in vivo [Internet]. Vol. 2, *Nature Neuroscience*. Springer Science and Business Media LLC; 1999. p. 352–7.

Ramirez-Roman ME, Billini CE, Ghezzi A. Epigenetic Mechanisms of Alcohol Neuroadaptation: Insights from *Drosophila* [Internet]. Vol. 12, *Journal of Experimental Neuroscience*. SA,E Publications; 2018.

Rao, M.S. Jacobson, M. (Ed.). *Developmental neurobiology*. Springer Science & Business Media, 2006.

Rico E, Rosemberg D, Dias R, Bogo M, Bonan C. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain [Internet]. Vol. 174, *Toxicology Letters*. Elsevier BV; 2007. p. 25–30.

Rico EP, Rosemberg DB, Seibt KJ, Capiotti KM, Da Silva RS, Bonan CD. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets [Internet]. Vol. 33, *Neurotoxicology and Teratology*. Elsevier BV; 2011. p. 608–17.

Rink, E, Guo, S. The too few mutant selectively affects subgroups of monoaminergic neurons in the zebrafish forebrain. *Neuroscience*, v. 127, n. 1, p. 147–154, jan. 2004.

Rosemberg DB, Braga MM, Rico EP, Loss CM, Córdova SD, Mussulini BHM, et al. Behavioral effects of taurine pretreatment in zebrafish acutely exposed to ethanol [Internet]. Vol. 63, *Neuropharmacology*. Elsevier BV; 2012. p. 613–23.

Rosemberg DB, da Rocha RF, Rico EP, Zanotto-Filho A, Dias RD, Bogo MR, et al. Taurine prevents enhancement of acetylcholinesterase activity induced by acute ethanol exposure and decreases the level of markers of oxidative stress in zebrafish brain [Internet]. Vol. 171, Neuroscience. Elsevier BV; 2010. p. 683–92.

Santangelo V, Cavallina C, Colucci P, Santori A, Macri S, McGaugh JL, et al. Enhanced brain activity associated with memory access in highly superior autobiographical memory [Internet]. Vol. 115, Proceedings of the National Academy of Sciences. Proceedings of the National Academy of Sciences; 2018. p. 7795–800.

Sarter, M, Bruno, JP. Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. *Brain Research Reviews*, v. 23, n. 1–2, p. 28–46, fev. 1997.

Sattler, R, Rothstein, JD. Regulation and Dysregulation of Glutamate Transporters. In: *Neurotransmitter Transporters*. [s.l.] Springer-Verlag, [s.d.]. p. 277–303.

Savio LEB, Vuaden FC, Kist LW, Pereira TC, Rosemberg DB, Bogo MR, et al. Proline-induced changes in acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain: Reversal by antipsychotic drugs [Internet]. Vol. 250, Neuroscience. Elsevier BV; 2013. p. 121–8.

Senger MR, Rico EP, de Bem Arizi M, Frazzon APG, Dias RD, Bogo MR, et al. Exposure to Hg²⁺ and Pb²⁺ changes NTPDase and ecto-5'-nucleotidase activities in central nervous system of zebrafish (*Danio rerio*) [Internet]. Vol. 226, Toxicology. Elsevier BV; 2006. p. 229–37.

Shivakumar, M, Subbanna, S, Joshi, V, Basavarajappa, BS. (2020). Postnatal Ethanol Exposure Activates HDAC-Mediated Histone Deacetylation, Impairs Synaptic Plasticity Gene Expression and Behavior in Mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology*.

Siqueira, L, Smith, VC. Binge Drinking. *Pediatrics*, v. 136, n. 3, p. e718–e726, 31 ago. 2015.

Sokolenko, E, Nithianantharajah, J, Jones, NC. (2020). MK-801 impairs working memory on the Trial-Unique Nonmatch-to-Location test in mice,

but this is not exclusively mediated by NMDA receptors on PV+ interneurons or forebrain pyramidal cells. *Neuropharmacology*, 108103.

Stefanko DP, Barrett RM, Ly AR, Reolon GK, Wood MA. Modulation of long-term memory for object recognition via HDAC inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S a*. 2009;106(23):9447-9452.

Vallano, ML. Developmental Aspects of NMDA Receptor Function. *Critical Reviews™ in Neurobiology*, v. 12, n. 3, p. 177–204, 1998.

Vargas LS, Ramires Lima K, Piaia Ramborger B, Roehrs R, Izquierdo I, Mello-Carpes PB. Catecholaminergic hippocampal activation is necessary for object recognition memory persistence induced by one-single physical exercise session [Internet]. Vol. 379, *Behavioural Brain Research*. Elsevier BV; 2020. p. 112356.

Vascotto, SG, Beckham, Y, Kelly, GM. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochemistry and Cell Biology*, v. 75, n. 5, p. 479–485, 1 out. 1997.

Vik PW, Cellucci T, Jarchow A, Hedt J. Cognitive impairment in substance abuse [Internet]. Vol. 27, *Psychiatric Clinics of North America*. Elsevier BV; 2004. p. 97–109.

Volianskis A, France G, Jensen MS, Bortolotto ZA, Jane DE, Collingridge GL. Long-term potentiation and the role of N -methyl- d -aspartate receptors [Internet]. Vol. 1621, *Brain Research*. Elsevier BV; 2015. p. 5–16.

Von Bernhardt, R, Bernhardt, LE, Eugenín, J. What Is Neural Plasticity? *The Plastic Brain*, 2017. p. 1–15.

Vuaden FC, Savio LEB, Rico EP, Mussulini BHM, Rosemberg DB, de Oliveira DL, et al. Methionine Exposure Alters Glutamate Uptake and Adenine Nucleotide Hydrolysis in the Zebrafish Brain [Internet]. Vol. 53, *Molecular Neurobiology*. Springer Science and Business Media LLC; 2014. p. 200–9.

White, AM, Matthews, DB, Best, PJ. Ethanol, memory, and hippocampal function: A review of recent findings. *Hippocampus*, v. 10, n. 1, p. 88–93, 2000.

WHO. Global status report on alcohol and health 2014. Luxembourg: World Health Organization, 2014.

WHO. Global status report on alcohol and health 2018. Geneva: World Health Organization, 2018.

Winters, BD, Bussey, TJ. Removal of cholinergic input to perirhinal cortex disrupts object recognition but not spatial working memory in the rat. *European Journal of Neuroscience*, v. 21, n. 8, p. 2263–2270, abr. 2005.

Woolf, NJ, Butcher, L L. Cholinergic systems mediate action from movement to higher consciousness. *Behavioural Brain Research*, v. 221, n. 2, p. 488–498, ago. 2011.

Yang L, Ho NY, Alshut R, Legradi J, Weiss C, Reischl M, et al. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals [Internet]. Vol. 28, *Reproductive Toxicology*. Elsevier BV; 2009. p. 245–53.

Zenki KC, Mussulini BHM, Rico EP, Oliveira DL, Rosemberg DB. Effects of ethanol and acetaldehyde in zebrafish brain structures: An in vitro approach on glutamate uptake and on toxicity-related parameters [Internet]. Vol. 28, *Toxicology in Vitro*. Elsevier BV; 2014. p. 822–8.

ANEXO
ANEXO A – Parecer da Comissão Ética no Uso de Animais



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de 09/06/2020.

Título do projeto	Avaliação neuroquímica e do comportamento de consolidação da memória de aprendizado relacionada ao uso repetitivo de do álcool em peixe-zebra
Project title	Neurochemical assessment and consolidation of learning memory behavior related to repetitive use of alcohol in zebrafish
Número do protocolo Protocol number	37/2020
Pesquisador principal Principal Investigator	Eduardo Pacheco Rico
Pesquisadores Researchers	Guilherme Lodetti da Silva, Henrique Teza Bernardo, Ana Caroline Salvador de Farias, Karolyne de Pieri Picler, Eduardo Ronconi Dondossola, Samira Leila Baldin, Suzielen Damini Pacheco.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	20/06/2020 a 20/06/2021
Espécie/linhagem/raça	Peixe**/Danio rerio
Idade/Peso	4 meses/0,400g
Número de animais	Masculino 92 + Feminino 92 = 184
Procedência	Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CNPJ 92.969.856/0001-98.

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Samira da Silva Valvassori
Coordenadora do CEUA

Criciúma-SC, 09 de junho de 2020.