

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

**SULINGUE CASAGRANDE VISENTIN**

**EXPOSIÇÃO PROLONGADA AO FLUORETO DE SÓDIO ALTERA O  
SISTEMA GLUTAMATÉRGICO E PARÂMETROS  
COMPORTAMENTAIS EM PEIXE-ZEBRA**

**CRICIÚMA**

**2019**

**SULINGUE CASAGRANDE VISENTIN**

**EXPOSIÇÃO PROLONGADA AO FLUORETO DE SÓDIO ALTERA O  
SISTEMA GLUTAMATÉRGICO E PARÂMETROS  
COMPORTAMENTAIS EM PEIXE-ZEBRA**

Dissertação de Mestrado apresentada 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**

**2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

V829e Visentin, Sulingue Casagrande.

Exposição prolongada ao fluoreto de sódio altera o sistema glutamatérgico e parâmetros comportamentais em peixe-zebra / Sulingue Casagrande Visentin. - 2019.

54 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2019.

Orientação: Eduardo Pacheco Rico.

1. Flúor. 2. Fluoreto de sódio - Efeitos adversos. 3. Glutamato. 4. N-metil-D-aspartato.  
I. Título.

CDD 23. ed. 553.95

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101  
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC

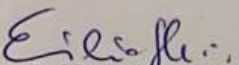



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA - PROACAD  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)  
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

---

#### ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 334

Com início às 9h (nove horas) do dia treze do mês de dezembro de 2019 (dois mil e dezenove), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Sulingue Casagrande Visentin** sob a orientação do **Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico**, intitulada “EXPOSIÇÃO PROLONGADA AO FLUORETO DE SÓDIO ALTERA O SISTEMA GLUTAMATÉRGICO E PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS EM PEIXE-ZEBRA”. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Alexandra Ioppi Zugno (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Profa. Dra. Cinara Ludvig Gonçalves (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada e Profa. Dra. Patricia Fernanda Schuck (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 10:30h (dez horas e trinta minutos), 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. Emílio Luiz Streck, Coordenador Adjunto do Programa. Criciúma, 13h (treze) de dezembro de 2019 (dois mil e dezenove).

  
Prof. Dr. Emílio Luiz Streck  
Coordenador Adjunto PPGCS  
**Prof. Dr. Emílio Luiz Streck**  
Coordenador Adjunto do PPGCS

  
**Fernanda Nunes Peruchi**  
Assistente Administrativo

## FOLHA INFORMATIVA

Esta dissertação foi elaborada seguindo a Resolução 07/2015 do PPGCS no estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Neurologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Dedico esse trabalho à minha família em especial aos meus adoráveis filhos Thayna e Theo por estarem sempre tão presentes mesmo na minha ausência e ao meu esposo Marcos por ser o apoio e calma aos meus anseios.

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela dádiva da vida e por me permitir realizar esse sonho com muita saúde durante 9 meses de gestação com total disposição e aproveitamento. Obrigado por me permitir errar, aprender e crescer!

Ao meu filho Theo que se comportou muito bem por 9 meses quietinho na barriga para que a mamãe assistisse as aulas, trabalhasse e pesquisasse com saúde, vontade, disposição e amor. Agradeço ao pós - nascimento também por você ser um bebê tranquilo, amoroso que me acalma, ensina e transforma com um simples olhar e um toque de mão.

A minha primogênita Thayna por sempre entender as minhas ausências em assistir, buscar e levar em suas atividades e também por ser essa menina dócil, compreensiva, educada e amorosa como todos. Ahhh e também por ser essa “mãezinha-mãe” do Theo.

Ao meu amor Marcos que sempre teve muita paciência para me ajudar a enfrentar o mundo da informática e muito amor para me abraçar nos dias de cansaço.

À minha mãe Ivânia Marli Pezente Casagrande por me dar a vida, me incentivar e me auxiliar no suporte aos seus netos.

A minha irmã Paloma Casagrande Visentin por me ouvir, acalmar e apoiar nos momentos de fúria e cansaço.

Ao meu cunhado Jacson Natal juntamente com minha irmã Paloma por divertirem meus filhos enquanto eu me ausentava aos sábados e domingos.

A minha secretária Débora Paganini, por coordenar minha agenda, administrar minha ausência e traduzir inúmeros artigos para que eu conseguisse sempre exercer meus múltiplos papéis profissional e pessoal dentro do prazo.

Aos meus queridos pacientes por serem o motivo da minha inesgotável sede em apreender e por compreenderem as inúmeras vezes que precisei remanejar horários na agenda para estar presente em aulas.

A minha colaboradora Meri por cuidar tão bem do meu bebê nos vários dias que precisei ir para a Universidade.

Ao meu irmão e guia espiritual Douglas que durante sua passagem aqui na terra sempre torceu pelos meus sonhos.

Ao meu orientador professor Dr. Eduardo Pacheco Rico por me acolher, orientar e possibilitar a trazer a minha amada Odontologia para seu mundo aquático.

À equipe do Laboratório de Sinalização Neural e Psicofarmacologia pelo apoio com a manutenção dos animais e por toda ajuda realizada, em especial aos colegas Leila, Karoline, Ana Carolina, Suzielen, Niuany e Henrique por estarem ativamente participando das análises experimentais desse trabalho.

Aos professores do mestrado por compartilharem ensinamentos e instigarem ainda mais a paixão pela docência.

Aos novos colegas, conhecidos e amigos que o mestrado me presenteou em especial a minha veterana de mestrado Maria Cecília Manenti por me auxiliar na interpretação e escrita da parte funcional laboratorial.

A minha supervisora de mestrado Thaís Fernandes por me acolher na disciplina de farmacologia da 3ª fase do curso de Odontologia e aos alunos por participarem e confiarem nos meus ensinamentos.

A Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) por toda infraestrutura, apoio, qualidade e conforto oferecido aos alunos.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.



*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

*Madre Teresa de Calcuta*

## RESUMO

O flúor está amplamente distribuído no meio ambiente, sendo geralmente encontrado no solo, ar, rochas, alimentos e na água sob a forma de fluoretos. A ingestão de flúor na água de beber está associada à neurotoxicidade do desenvolvimento em crianças e adultos e manifestações psiquiátricas, incluindo letargia e memória. Uma vez que o seu consumo em excesso é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, pode acumular-se no cérebro e causar toxicidade no sistema nervoso central via alterações na sinalização glutamatérgica. A neurotoxicidade causada pelo flúor inclui alterações no metabolismo cerebral, níveis de aminas biogênicas, conteúdo de ácido nucléico, atividades de enzimas proteolíticas, aumento do estresse oxidativo e danos no DNA cerebral. Já foi demonstrado que a expressão de receptores de glutamato do tipo NMDA em cérebro de ratos são alterados quando expostos a altos níveis de fluoreto. Entretanto, ainda não existem evidências a respeito do efeito desta substância sobre a neurotransmissão glutamatérgica em peixe-zebra. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar se a exposição prolongada ao fluoreto de sódio (NaF) foi capaz de alterar a homeostase do sistema glutamatérgico e parâmetros comportamentais em peixe-zebra. Foram utilizados peixes-zebra adultos, divididos em quatro grupos experimentais, sendo eles um grupo controle e três grupos expostos ao NaF nas concentrações de 300 ppm, 500 ppm e 1000 ppm, por um período de 30 dias. Após esse tempo, os animais foram submetidos a testes comportamentais a fim de avaliar alterações no perfil locomotor/exploratório através do teste *Open tank* e interação social. Em seguida, os peixes foram eutanasiados e os cérebros retirados para avaliação da funcionalidade dos transportadores de glutamato. O grupo Fluoreto de Sódio (300ppm) apresentou maior preferência em permanecer no topo do aquário, além de uma diminuição no número de entradas e no número de latência nesta zona no teste *Open tank*. Em relação ao comportamento de interação social, houve redução significativa para a concentração de 1000 ppm. Concomitantemente foi observado uma redução na funcionalidade dos transportadores de glutamato no grupo 300ppm. Tais resultados permitem inferir que os peixes expostos a 300ppm de NaF exibem um comportamento ansiolítico e isso pode estar relacionado com o desequilíbrio da homeostasia cerebral, em especial dos transportadores glutamatérgicos. Os achados do presente estudo evidenciam a importância das alterações causadas pela exposição crônica ao NaF, uma vez que o NaF é uma substância amplamente utilizada na área odontológica e consumida na água potável.

**Palavras-chaves:** Flúor; Fluoreto de sódio; Glutamato; NMDA; Peixe-zebra.

## ABSTRACT

Fluoride is widely distributed in the environment and is often found in soil, air, rocks, food and water in the form of fluoride. Drinkable water intake is associated with developmental neurotoxicity in children and adults and psychiatric manifestations including lethargy and memory. Since its excess consumption is capable of crossing a blood-brain barrier, it can occur if the brain causes central nervous system toxicity via changes in glutamatergic signaling. Fluoride-applied neurotoxicity includes changes in brain metabolism, biological amino acid levels, nucleic acid content, proteolytic enzyme activities, increased oxidative stress, and brain DNA damage. Expression of NMDA-type glutamate receptors in rat brain has been shown to change when exposed to high fluoride levels. However, there are no values regarding the effect of this substance on glutamatergic neurotransmission in zebrafish. Therefore, the aim of this study was to evaluate whether prolonged exposure to Sodium fluoride (NaF) was able to alter glutamatergic system homeostasis and behavioral variables in zebrafish. Adult zebrafish were used, divided into four groups of experiments, one control group and three groups exposed to NaF at 300 ppm, 500 ppm and 1000 ppm for a period of 30 days. After this time, the animals were submitted to behavioral tests to evaluate alterations in the locomotor / exploratory profile through the *Open tank* and social interaction test. Then the fish were euthanized and retirees removed to assess the functionality of glutamate transporters. The Sodium Fluoride (300ppm) group has a higher preference for spent on top of the aquarium, as well as a decrease in the number of entrances and latency in this zone in the *Open tank test*. Regarding social interaction behavior, there was a significant reduction to a concentration of 1000 ppm. Concomitantly, a reduction in glutamate carrying capacity was observed in the group 300ppm. These results determine that fish exposed to 300ppm NaF exhibit anxiolytic behavior and this may be related to brain homeostasis imbalance, especially glutamatergic transporters. The findings of the present study highlight the importance of changes caused by exposure to NaF, since NaF is a substance rarely used in the dental area and consumed in drinking water.

**Keywords:** Fluoride; sodium fluoride; glutamate; NMDA; zebrafish. .

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Avaliação do efeito do fluoreto de sódio nos grupos Fluoreto de sódio (300ppm), Fluoreto de sódio (500ppm) e Fluoreto de sódio (1000ppm) sobre a distância total percorrida (A), velocidade média (B) e tempo imóvel (C) no aparato Open Tank.....	28
<b>Figura 2.</b> Avaliação do efeito do fluoreto de sódio nos grupos Fluoreto de sódio (300ppm), Fluoreto de sódio (500ppm) e Fluoreto de sódio (1000ppm) sobre o tempo (A), distância percorrida (B), número de entradas (C) e tempo de latência (D) na zona topo do aparato.....	29
<b>Figura 3.</b> Avaliação do efeito do fluoreto de sódio nos grupos Fluoreto de sódio (300ppm), Fluoreto de sódio (500ppm) e Fluoreto de sódio (1000ppm) sobre o tempo de permanência (A) e número de entradas (B) na zona meio do aparato Open Tank.....	30
<b>Figura 4.</b> Avaliação do efeito do fluoreto de sódio nos grupos Fluoreto de sódio (300ppm), Fluoreto de sódio (500ppm) e Fluoreto de sódio (1000ppm) sobre o tempo de permanência (A), distância percorrida (B) e número de entradas (C) na zona fundo do aparato Open Tank.....	31
<b>Figura 5.</b> Avaliação do efeito do fluoreto de sódio nos grupos Fluoreto de sódio (300ppm), Fluoreto de sódio (500ppm) e Fluoreto de sódio (1000ppm) sobre o perfil locomotor/exploratório.....	32
<b>Figura 6.</b> Avaliação do efeito do fluoreto de sódio nos grupos Fluoreto de sódio (300ppm), Fluoreto de sódio (500ppm) e Fluoreto de sódio (1000ppm) sobre o tempo de permanência no aparato de Preferência Social.....	33
<b>Figura 7.</b> Efeito do fluoreto de sódio sobre a funcionalidade dos receptores de glutamato em cérebro total de peixe-zebra. ....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

EAATs – Transportadores de aminoácidos excitatórios (do inglês, *excitatory amino acid transporters*)

iGluR – Receptores ionotrópicos de glutamato (do inglês, *Ionotropic glutamate receptor*)

KA – cainato

NaF – Fluoreto de sódio

NMDA – N-metil-D-aspartato

NMDARs – receptor N-metil-D-aspartato

NRC – Conselho Nacional de Pesquisa (do inglês, *National Research Council*)

PSD-95 – Proteína 95 de densidade pós-sináptica (do inglês, *postsynaptic density protein 95*)

QI - quociente de inteligência

SNC – Sistema Nervoso Central

SYN – Sinaptofisina (do inglês, *synaptophysin*)

UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense

VGLUTs – Transportadores vesiculares de glutamato (do inglês, *vesicular glutamate transporte*)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1 EXPOSIÇÃO AO FLÚOR .....	15
1.2 EFEITOS CEREBRAIS INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO AO FLÚOR .....	15
1.3 SINALIZAÇÃO GLUTAMATÉRGICA .....	17
1.4 PEIXE-ZEBRA COMO ORGANISMO MODELO NA ÁREA BIOMÉDICA .....	19
1.5 JUSTIFICATIVA .....	20
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>23</b>
3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO .....	23
3.2 ANIMAIS.....	23
3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	23
3.4 EXPOSIÇÃO DO PEIXE-ZEBRA AO FLUORETO DE SÓDIO .....	24
3.5 PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS.....	24
<b>3.5.1 Tarefa comportamental (<i>Open tank</i>)</b> .....	<b>24</b>
<b>3.5.2 Experimento comportamental de Preferência social</b> .....	<b>25</b>
3.6 ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	26
<b>3.6.1 Captação de glutamato</b> .....	<b>26</b>
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	27
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>35</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>43</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>54</b>
ANEXO A- PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS .....	54

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 EXPOSIÇÃO AO FLÚOR

O flúor está amplamente distribuído no meio ambiente, sendo geralmente encontrado no solo, ar, rochas, alimentos e na água sob a forma de fluoretos. Industrialmente, o flúor e os seus compostos são usados na produção de urânio, plásticos, vidro, cerâmicas, pesticidas, Teflon® (politetrafluoretileno) e produtos farmacêuticos. O flúor é geralmente um subproduto indesejado da produção de alumínio, fertilizantes e ferro (Peckham e Awofeso, 2014).

O fluoreto é uma substância química essencial para a fabricação de produtos na área odontológica, tais como cremes dentais e enxaguantes bucais, bem como usado também na fluoretação para o tratamento de água encanada. As principais fontes de exposição humana ao fluoreto são a água potável, alimentos, produtos odontológicos e pesticidas, segundo o *National Research Council* (NRC) (2006). O limite aceitável de fluoreto na água potável varia de 0,7 a 1,0 mg/L de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO) (2004). No entanto, certas partes do mundo, tais como África, Ásia e Mediterrâneo Oriental, a água pode apresentar concentrações de fluoreto de até 20 mg/L (WHO, 2004). Uma excessiva exposição de fluoreto, além de causar severos problemas à saúde, incluindo fluorose dental e esquelética, também é capaz de apresentar ação carcinogênica sobre diversos tecidos (Grandjean e Landrigan 2014). Além disso, níveis elevados podem induzir neurotoxicidade, os quais estão relacionados com neurodegeneração (Adedara et al., 2017). Como o flúor na água potável não altera sua cor, cheiro ou gosto, normalmente não há maneira de detectá-lo a menos que testado.

### 1.2 EFEITOS CEREBRAIS INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO AO FLÚOR

Diversos estudos epidemiológicos observacionais mostram que crianças em áreas com alto teor de flúor possuem escores de quociente de inteligência (QI) significativamente reduzidos comparados as crianças expostas a baixos teores da substância (Poureslami et al., 2011; Saxena et al., 2012; Seraj et al., 2012; Trivedi et al.,

2012; Choi et al., 2015; Aravind et al., 2016). Além disso, Strunecka et al. (2018) apontam que o flúor pode estar relacionado às desordens do espectro autista devido ao mecanismo de imunoexcitotoxicidade. A ingestão de flúor na água de beber está associada à neurotoxicidade do desenvolvimento em crianças e adultos e manifestações psiquiátricas, incluindo letargia e memória, dificuldades de pensamento (Spittle, 1994). O fluoreto tem a capacidade de formar complexos com outros elementos, prejudicando a função do sistema nervoso central (SNC) por meio de diferentes mecanismos neurotóxicos. Especificamente do ponto de vista celular, foi relatado que a neurotoxicidade do fluoreto inclui alterações no metabolismo cerebral, níveis de aminas biogênicas, conteúdo de ácido nucléico, atividades de enzimas proteolíticas juntamente com o aumento do estresse oxidativo e danos no DNA no cérebro (Vani e Reddy, 2000).

O SNC é vulnerável aos efeitos do flúor, visto que este elemento acumula-se nos tecidos cerebrais, podendo afetar estruturas como o hipocampo, responsável pelo aprendizado e memória. Uma grande preocupação é que em crianças em todo o mundo estão sendo expostas ao flúor, o qual possui ações neurotóxicas e com efeitos potenciais no desenvolvimento neurológico. O fluoreto também foi associado a lesões na função da tireoide e por alterar a formação neuronal no feto em desenvolvimento, resultando em alterações irreversíveis no cérebro fetal (Domingos et al., 2018).

Evidências indicam que a ingestão prolongada de quantidades excessivas de flúor pode exercer toxicidade crônica e afetar o SNC (Mullenix et al., 1995; Guan et al., 1998; Sharma et al., 2009). O cérebro humano em desenvolvimento é excepcionalmente vulnerável a exposições à substâncias químicas tóxicas e ocorrem grandes janelas de vulnerabilidade desenvolvimentista. O feto não está bem protegido contra produtos químicos industriais, já que a placenta não bloqueia a passagem de muitos agentes tóxicos ambientais da circulação materna para a fetal. Durante a vida fetal e a primeira infância, a barreira hematoencefálica fornece apenas proteção parcial contra a entrada de produtos químicos no SNC (Grandjean e Landrigan, 2014). Além da toxicidade induzida pelo flúor no desenvolvimento, o cérebro adulto também se mostra vulnerável a esta substância (Dec et al., 2017).



Nestas circunstâncias, o flúor em excesso pode atravessar a barreira hematoencefálica, acumular-se no cérebro e gerar danos ao SNC de animais experimentais (Narayanaswamy e Piler, 2010; Valdez-Jiménez et al., 2011), promovendo estresse oxidativo e apoptose, reduzindo a expressão de receptores colinérgicos de acetilcolina e prejudicando o aprendizado e a memória (Gao et al., 2009; El-Iethy et al., 2010; Liu et al., 2010; Liu et al., 2011). Curiosamente, a destruição neuronal e a lesão sináptica causada por fluorose crônica envolve excitotoxicidade, sendo que tal evento está relacionado com alterações na sinalização glutamatérgica (Blaylock, 2004).

### 1.3 SINALIZAÇÃO GLUTAMATÉRGICA

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC de vertebrados. Após sua liberação nos terminais pré-sinápticos, este aminoácido exerce seus efeitos via ativação de receptores ionotrópicos e metabotrópicos (Gasic e Holmann, 1994). Os receptores ionotrópicos são uma família de canais iônicos denominados de acordo com seu agonista sintético mais seletivo: NMDA, o qual ativa um canal de cálcio, AMPA e kainato (KA), que permeiam a entrada de sódio e potássio. Os receptores metabotrópicos, acoplam-se a proteínas-G (proteínas ligantes de nucleotídeos da guanina) e modulam efetores intracelulares, como a fosfolipase C e adenilato ciclase. Ambos os compostos são experimentalmente empregados no sentido de verificar seletivamente as ações excitatórias na sinalização glutamatérgica em nível de receptores (Danbolt, 2001).

As funções promovidas pelo glutamato estão envolvidas com a plasticidade sináptica, aprendizagem, memória e desenvolvimento neural (Izquierdo et al., 1999). A manutenção do tônus glutamatérgico em níveis fisiológicos é exercida através de um mecanismo de transporte dependente de sódio. Os astrócitos captam o glutamato extracelular através de proteínas transportadoras e o transformam em glutamina, a qual pode ser liberada por estas células e ser novamente convertida a glutamato nos neurônios (ciclo glutamato-glutamina) (Danbolt, 2001).

Os transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) representam uma família de proteínas, sendo que já foram identificados e caracterizados cinco subtipos de transportadores no cérebro de mamíferos com distribuição e funcionalidade distintas: O EAAT1 é primariamente um transportador astrogliar e a principal proteína de transporte no desenvolvimento do sistema nervoso (Furuta et al., 1997a). O EAAT2 é um dos dois mais abundantes transportadores de glutamato no SNC de adulto (Macnab e Pow, 2007), enquanto o EAAT3, também conhecido como EAAC1, é um transportador neuronal encontrado com mais abundância em membranas pós-sinápticas (Furuta et al., 1997b). O EAAT4 está limitado às células de Purkinje no cerebelo (Fairman et al., 1995) e o EAAT5 localizado nos fotorreceptores e células bipolares de retina (Arriza et al., 1997; Pow, 2001). A excitotoxicidade causada por uma hiper-estimulação dos transportadores de glutamato é a maior causa de morte neuronal em diversas doenças cerebrais, incluindo a epilepsia (Meldrum, 2000). Os prejuízos cognitivos estão relacionados com perda de massa encefálica, ocasionada pela neurodegeneração apoptótica através de dois mecanismos: bloqueio dos receptores de glutamato NMDA e ativação excessiva de receptores de GABA (Olney et al., 2001).

Wei e colaboradores (2017) mostraram que o padrão de expressão de receptores NMDA (NMDARs) no cérebro de ratos são alterados quando expostos a altos níveis de fluoreto. Os NMDARs, que são amplamente expressos no SNC e possuem propriedades biofísicas e farmacológicas únicas (Bouvier et al., 2015), desempenham papéis-chave na neurotransmissão e em conexão com doenças neurológicas. Estes pertencem à família dos receptores de glutamato ionotrópico (iGluR), que contém os receptores  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazalepropiónico (AMPA), cainato e delta (Regan et al., 2015).

Está ficando cada vez mais claro que os NMDARs podem desempenhar um papel-chave em muitas funções fundamentais, como mediar o fluxo de cálcio, promover a plasticidade sináptica neuronal e participar nos processos de aprendizagem e memória (Riedel et al., 2003; Qiu et al., 2011). Ao mesmo tempo, a excitação excessiva dos NMDARs pode levar ao aumento do influxo de cálcio e a consequente sobrecarga de cálcio intracelular, ativando uma série de processos intracelulares que induzem neurotoxicidade e apoptose (Paoletti et al., 2013).

#### 1.4 PEIXE-ZEBRA COMO ORGANISMO MODELO NA ÁREA BIOMÉDICA

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um pequeno teleósteo (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 e genômica, teratologia, biologia do desenvolvimento, comportamento e toxicologia (Vascotto et al., 1997). Este peixe apresenta características favoráveis que complementam os modelos experimentais existentes, tais como: pequeno espaço requerido para manutenção, baixo custo por animal, rápido desenvolvimento, grande prole, embriões translúcidos e suscetíveis à manipulação e microinjeção (Lele e Krone, 1996). Além disso, grandes segmentos dos cromossomos do peixe-zebra estão em sintonia com os cromossomos humanos e dos camundongos e muitos genes apresentam um alto grau de similaridade, quando comparados em sua sequência (Barbazuk et al., 2000). O Instituto Sanger iniciou em 2001 o sequenciamento do genoma total do peixe-zebra, observando uma homologia de aproximadamente 70-80% com o genoma humano (Stern e Zon, 2003) e o seu genoma mitocondrial já está sequenciado, servindo de base para estudos filogenéticos (Broughton et al., 2001).

Esta espécie tem sido amplamente utilizada como modelo experimental para o estudo das bases moleculares da neurobiologia, auxiliando na identificação de genes envolvidos na formação de circuitos neuronais, no comportamento e nos mecanismos envolvidos na neuropatogênese (Barbazuk et al., 2000; Goldsmith, 2004; Guo, 2004; Gerlai et al., 2006; Lieschke e Currie, 2007; Ebarasi et al., 2011). Outro aspecto importante que contribui para a utilização deste modelo é o fato de que esta espécie absorve os componentes diretamente da água pelas suas brânquias, acumulando-os em diferentes tecidos, dentre os quais o SNC (Grosell e Wood, 2002; Blank et al., 2009; Froehlicher et al., 2009; Yang et al., 2009).

Diversos sistemas de neurotransmissão amplamente estudados em mamíferos já foram identificados e descritos em peixe-zebra, tais como: colinérgico (Behra et al., 2002), dopaminérgico (Boehmler et al., 2004), GABAérgico (Kim et al., 2004), glutamatérgico (Edwards e Michel, 2002), histaminérgico (Kaslin e Panula, 2001), serotoninérgico (Rink e Guo, 2004) e purinérgico (Kucenas et al., 2003; Rico et

al., 2003; Rosemberg et al., 2010; Savio et al., 2012; Vuaden et al., 2012; Senger et al., 2004). No sistema glutamatérgico, em peixe-zebra foram identificados os genes relacionados aos transportadores de glutamato, o padrão de expressão destes genes, bem como a funcionalidade dos transportadores dependentes de Na<sup>+</sup> em distintas estruturas cerebrais (Rico et al., 2010).

Singh et al. (2017) demonstrou que o fluoreto de sódio (NaF) em peixe-zebra é capaz de alterar o padrão de expressão de genes relacionados a inflamação, apoptose e reparo de DNA. Além disso, o NaF promove alterações na homeostasia do sistema hormonal do peixe-zebra. Sua exposição em concentrações consideradas elevadas descompensou a função endócrina da tireoide no peixe-zebra macho (Jianjie et al., 2016).

Com relação aos efeitos moleculares, o fluoreto em concentrações encontradas no ecossistema se mostrou capaz de induzir respostas de genotoxicidade e mutegenicidade (Castro et al., 2018). Com relação a neurotoxicidade, Mukhopadhyay e colaboradores (2015) mostraram que alterações comportamentais de hiperatividade e altera o padrão de expressão para os genes relacionados à enzimas antioxidantes e fatores nucleares em tecido cerebral. Estudo realizado em peixe-zebra nas etapas iniciais do desenvolvimento demonstrou que elevadas concentrações de NaF capaz de induzir fluorose em tecido dentário (Zhang et al., 2016). Apesar de haver evidências relacionadas à toxicidade, e de forma sistêmica, ainda faltam estudos relacionados ao efeito da exposição do NaF nesse modelo animal relacionado à função neuroquímica e comportamental.

## 1.5 JUSTIFICATIVA

Considerando os aspectos acima mencionados, é de grande relevância a utilização do peixe-zebra para o estudo dos mecanismos relacionados à toxicidade de substâncias. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo geral verificar se o NaF é capaz de influenciar a homeostase neuroquímica e comportamental no SNC de peixe-zebra. A avaliação do panorama neuroquímico da neurotransmissão glutamatérgica de peixes-zebra será um passo para o entendimento dos efeitos neurotóxicos desta

importante substância usada tanto na odontologia, bem como consumida na forma de aditivo para o tratamento de água potável.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos da exposição prolongada ao fluoreto de sódio no sistema glutamatérgico e em parâmetros comportamentais em peixe-zebra.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a exposição ao fluoreto de sódio no comportamento locomotor/exploratório de peixe-zebra utilizando o aparato *Open tank*,

- Avaliar a exposição ao fluoreto de sódio no comportamento de interação social em peixe-zebra;

- Verificar a atividade cerebral dos transportadores de glutamato e a suscetibilidade à exposição ao fluoreto de sódio em peixe-zebra.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurologia Experimental da Universidade do Extremo Sul Catarinense, incluindo todos os procedimentos que envolvem a indução do modelo de exposição ao fluoreto de sódio seguido dos respectivos testes bioquímicos e comportamentais.

#### **3.2 ANIMAIS**

Foram utilizados 120 peixes-zebra (*Danio rerio*) adultos (com aproximadamente 4 meses de idade) de ambos os sexos da linhagem heterogênea do fenótipo short-fin (SF). Os animais foram obtidos através do biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e mantidos no Laboratório de Sinalização Neural e Psicofarmacologia, da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), em aquários de 50 L com água declorada e continuamente aerada, em um número de 30 animais por aquário. A temperatura da água foi regulada em  $28,5 \pm 1^\circ \text{C}$  e os peixes foram mantidos em ciclo de claro-escuro de 14h/10h controlado por fotoperíodo (luzes acesas às 7h; luzes apagadas às 21h), sendo que as condições físico-químicas da água eram averiguadas antes e depois dos experimentos. Os peixes foram alimentados duas vezes por dia com artêmias. Todos os procedimentos com a utilização de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESC sob o protocolo 014/2019-1 (Anexo A).

##### **3.2.1 Grupos experimentais**

#### **3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Os animais foram divididos em quatro grupos do estudo, sendo eles: 1) grupo controle; 2) exposto fluoreto de sódio (300 ppm); 3) exposto fluoreto de sódio (500

ppm); 4) exposto fluoreto de sódio (1000 ppm). As exposições ocorreram por um período de 30 dias.

### 3.4 EXPOSIÇÃO DO PEIXE-ZEBRA AO FLUORETO DE SÓDIO

Neste projeto, foi utilizado o protocolo de exposição ao NaF em que os animais foram incluídos em grupos independentes nas concentrações de 300 ppm, 500 ppm e 1000 ppm por 30 dias, de forma constante. Para isto, a troca da solução ocorreu a cada 48 horas. Após os experimentos, foram avaliados parâmetros comportamentais (exploratório e interação social) conforme descrito abaixo. Em seguida os mesmos foram anestesiados em solução de tricáina (160µg/mL) e posteriormente eutanasiados por decapitação para a obtenção dos cérebros para os ensaios neuroquímicos.

### 3.5 PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

#### 3.5.1 Tarefa comportamental (*Open tank*)

A tarefa do *open tank* se propõe a avaliar basicamente a locomoção/exploração vertical do peixe-zebra, bem como comportamentos relacionados à resposta a novidade (Cachat et al., 2010; Rosemberg et al., 2012). A avaliação comportamental dos animais ocorreu de acordo com o método previamente descrito pelo Laboratório do presente estudo. Após o período de execução do protocolo de privação a exposição ao álcool, os animais foram transferidos ao aparato do *open tank*, cujo formato trapezoidal possui dimensões previamente padronizadas na literatura (23,9 cm de comprimento na parte inferior x 28,9 cm na parte superior x 15,1 cm de altura e 15,9 cm na diagonal, possuindo 7,4 cm de profundidade na parte superior e 6,1 cm na parte inferior) (Levin et al., 2007). O aquário foi preenchido com água até 1,5 L e dividido virtualmente em três áreas verticais idênticas (inferior, central e superior) contendo cinco sessões horizontais por área.



O perfil comportamental dos animais foi analisado individualmente e filmado por um período de 6 minutos, sendo que foram avaliados os seguintes parâmetros: latência para transição às áreas central e superior do aparato, tempo nas áreas central e superior, número de entradas nas áreas central e superior, tempo médio de duração das entradas nas áreas central e superior, distância percorrida, velocidade média, ângulo de giro absoluto e sinuosidade do percurso. Além disso, foram acompanhadas as respostas motoras em diferentes fases do desenvolvimento. Estes parâmetros são escolhidos devido ao repertório comportamental do peixe-zebra e baseados na tendência natural do animal em primeiramente explorar a área inferior do aparato e posteriormente transitar nas áreas superiores (Wong et al., 2010). Todos os parâmetros comportamentais foram quantificados através de análise automatizada utilizando o *software* ANY-maze® (Stoelting, CO, EUA).

### **3.5.2 Experimento comportamental de Preferência social**

O aparato utilizado para a realização desse teste foi um aquário de vidro transparente medindo 29,5 cm de comprimento x 15 cm de altura x 9,5 cm largura. Esse aquário foi dividido em três compartimentos, denominados Coespecífico, Centro e Vazio. Ao lado desse aquário, em cada ponta, foram colocados dois aquários menores medindo 20 cm de comprimento x 14,5 cm de altura x 9 cm de largura. O aquário menor posicionado ao lado do compartimento Coespecífico recebeu cinco peixes e o outro, ao lado do compartimento vazio, nenhum (Gerlai et al., 2000).

A água utilizada no aparato para os animais durante o experimento foi obtida dos respectivos aquários onde os animais eram mantidos quando não estavam sendo expostos, portanto, a cada mudança de grupo no momento do teste o aquário de teste de interação social foi lavado e a água trocada pela do respectivo aquário do grupo. Os testes comportamentais aconteceram no período da manhã, tanto dos grupos expostos quanto do grupo controle.

No momento do experimento os animais foram depositados no centro do aparato e durante seis minutos nadaram livremente. Para a gravação e posterior análise

de dados foi utilizado o programa ANY-maze® (Stoelting CO, USA). Esse programa considera que os primeiros segundos do animal no teste são frutos do seu comportamento de ambientação e não contabiliza esses movimentos nos resultados finais.

Na análise de dados é mensurado o tempo que cada animal permanecerá em cada um dos três compartimentos do aquário, sua velocidade média e a distância total percorrida.

### 3.6 ANÁLISE BIOQUÍMICA

#### 3.6.1 Captação de glutamato

A metodologia de captação de glutamato foi realizada com base nas condições utilizadas referente à caracterização previamente realizada no Laboratório do presente estudo, em diferentes estruturas do SNC desta espécie (Rico et al., 2010). Os peixes foram submetidos à anestesia por imersão em tricáína 160 µg/ml e mortos por decapitação. O encéfalo foi retirado e dissecado e pré-incubado a 37°C durante 15 minutos em 0,28 ml de HBSS. Após este período, 20 µl de uma solução contendo 0,33 µCi/ml de glutamato de l-[2,3-3H], com glutamato não marcado (100 µM) a 37°C foi adicionada ao meio. As incubações com glutamato marcado foram paradas após 7 minutos por duas lavagens com 1 ml de HBSS arrefecido com gelo.

No término do ensaio, foi adicionado NaOH 0,5 N às estruturas cerebrais, mantendo-se sobre agitação durante a noite. O teor proteico foi medido utilizando alíquotas de homogenato (10 µL) seguindo o método previamente descrito Peterson (1977). Foram tomadas amostras para determinação do conteúdo intracelular de l-[2,3-3H] glutamato por contagem de cintilação. A captação independente de sódio foi determinada usando HBSS contendo N-metil-d-glucamina em vez de cloreto de sódio. Os resultados foram subtraídos da absorção total para obter a captação sódio-dependente. Para as análises *in vitro*, o NaF foi adicionado diretamente ao sistema de incubação e preincubado por 10 minutos. Em seguida foi adicionado o glutamato marcado e conduzida a incubação conforme previamente descrito.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os ensaios bioquímicos, os resultados foram avaliados pela análise de variância de uma via (One-way ANOVA), seguida pelo teste de Tukey quando necessário, onde  $p < 0,05$  indicará diferença significativa. Para os experimentos comportamentais, foi utilizada ANOVA seguido do teste de Tukey como *post hoc*.

## 4 RESULTADOS

Para avaliar o perfil exploratório/locomotor em peixe-zebra expostos ao NaF foi utilizado o teste do *Open tank*. Os parâmetros comportamentais avaliados neste teste foram: distância percorrida, velocidade média e tempo imóvel. Quando avaliado o perfil locomotor dos animais através desses parâmetros, não foi possível verificar alterações significativas entre as diferentes concentrações de NaF em relação ao grupo controle (Figura 1).

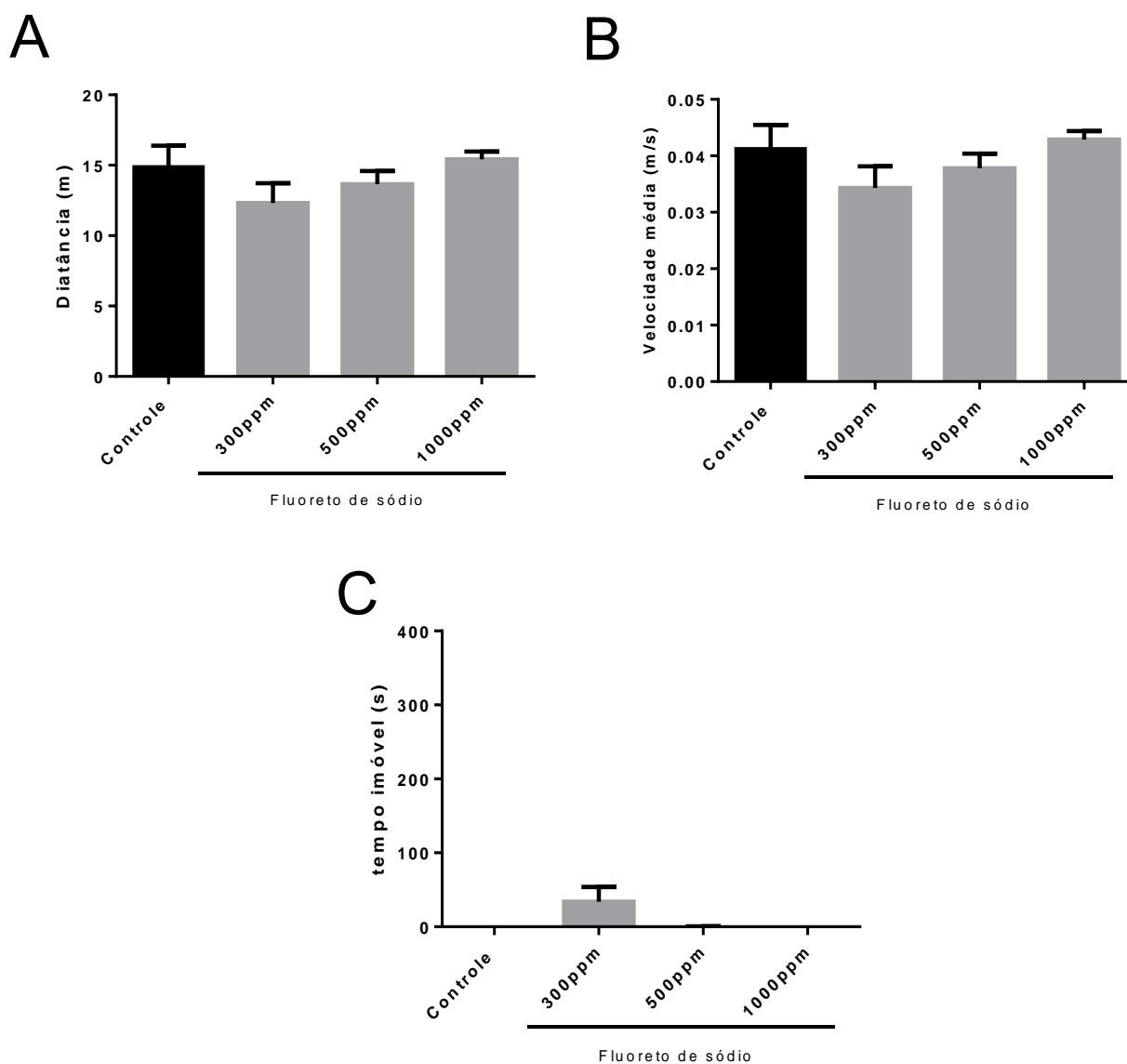
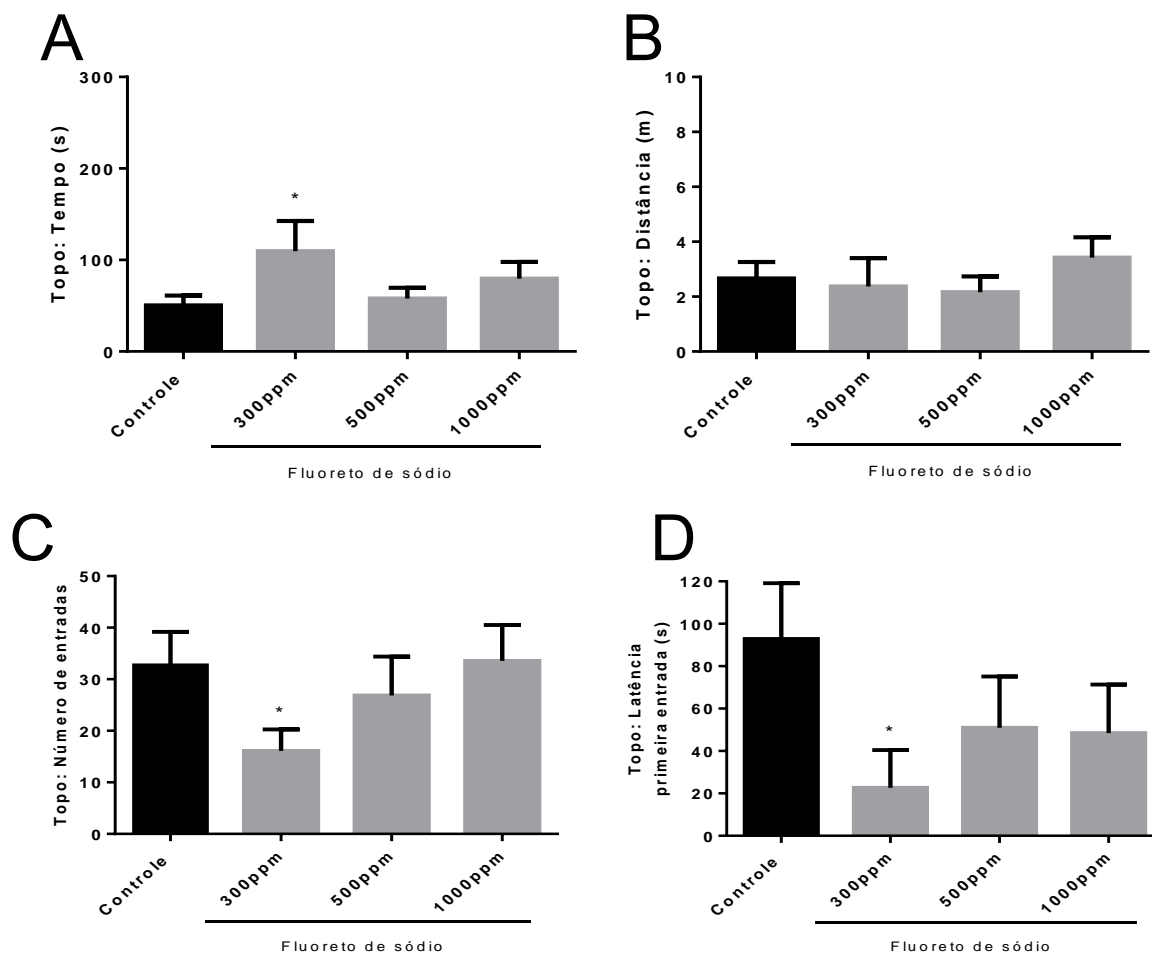


Figura 1. Avaliação do efeito do fluoreto de sódio nos grupos Fluoreto de sódio (300ppm), Fluoreto de sódio (500ppm) e Fluoreto de sódio (1000ppm) sobre a distância total percorrida (A),

**velocidade média (B) e tempo imóvel (C) no aparato Open Tank.** \* $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

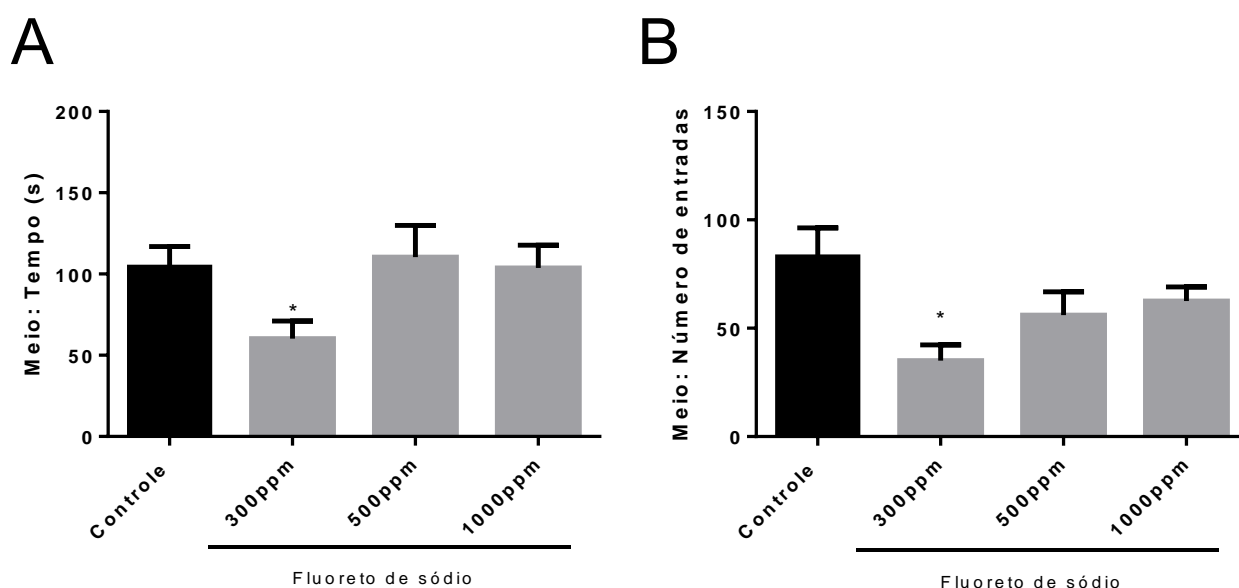
Com relação a avaliação do perfil exploratório, o tempo de permanência dos animais em cada zona do aparato foi mensurado durante seis minutos, sendo que o resultado de cada grupo foi comparado ao seu respectivo controle. Na zona topo, os parâmetros avaliados foram: tempo, distância, número de entradas e tempo de latência na primeira entrada. É possível verificar que somente o grupo Fluoreto de sódio (300ppm) apresentou aumento significativo no tempo de permanência ( $p=0,0045$ ); diminuição no número de entradas ( $p=0,0031$ ) e diminuição no tempo de latência na zona topo ( $p=0,0033$ ), enquanto que na distância nenhum dos grupos apresentou diferença significativa (Figura 2).



**Figura 2. Avaliação do efeito do fluoreto de sódio nos grupos Fluoreto de sódio (300ppm), Fluoreto de sódio (500ppm) e Fluoreto de sódio (1000ppm) sobre o tempo (A), distância percorrida**

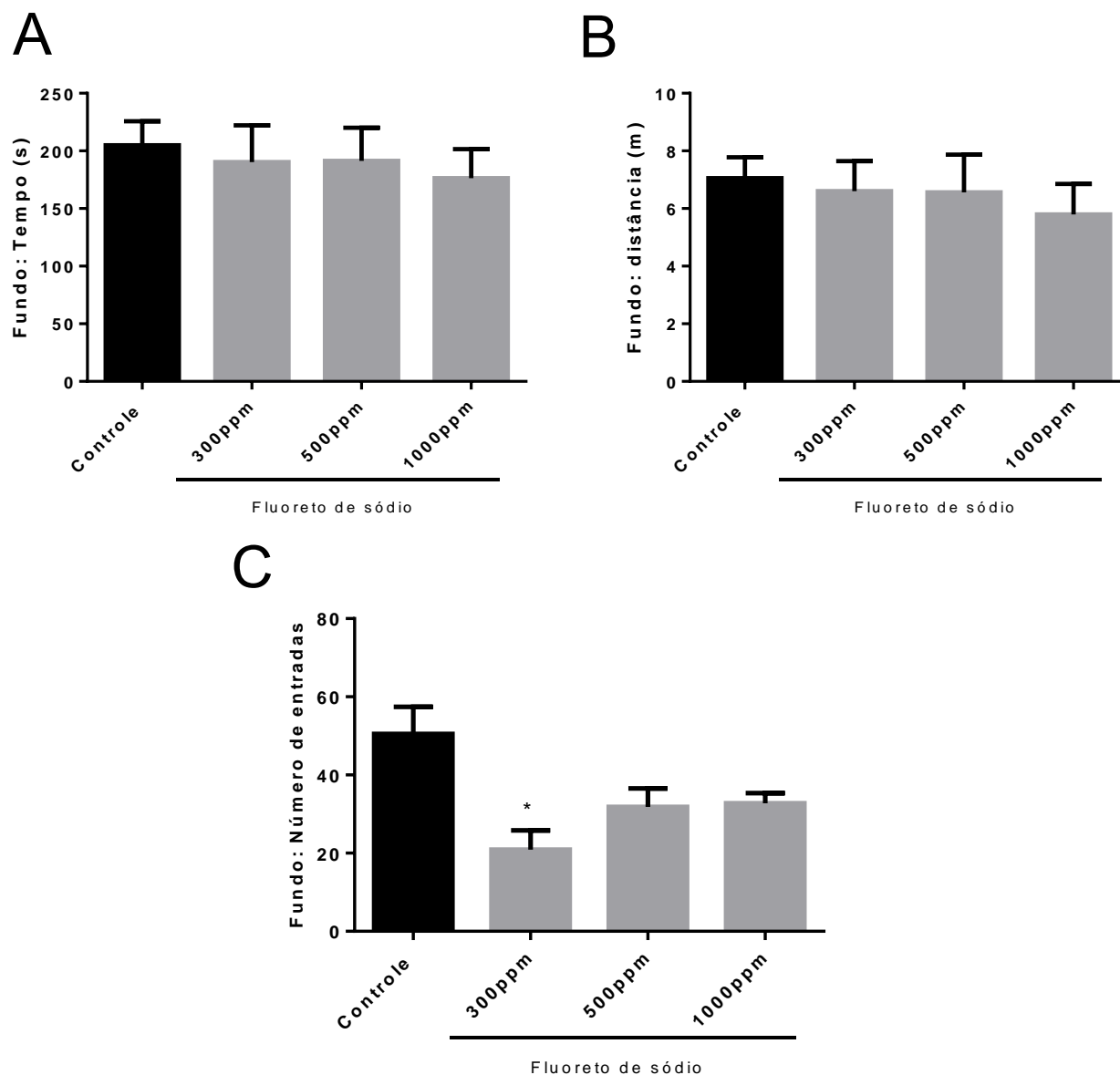
**(B), número de entradas (C) e tempo de latência (D) na zona topo do aparato.** \* $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

Na zona meio, foram avaliados apenas o tempo de permanência e o número de entradas nesta área. Novamente, percebe-se que somente o grupo Fluoreto de sódio (300ppm) apresentou uma alteração significativa para este compartimento ( $p=0,0022$ ). Foi observada uma diminuição significativa do grupo Fluoreto de sódio (300ppm) em relação ao controle tanto no tempo de permanência como também no número de entradas nesta zona (Figura 3).



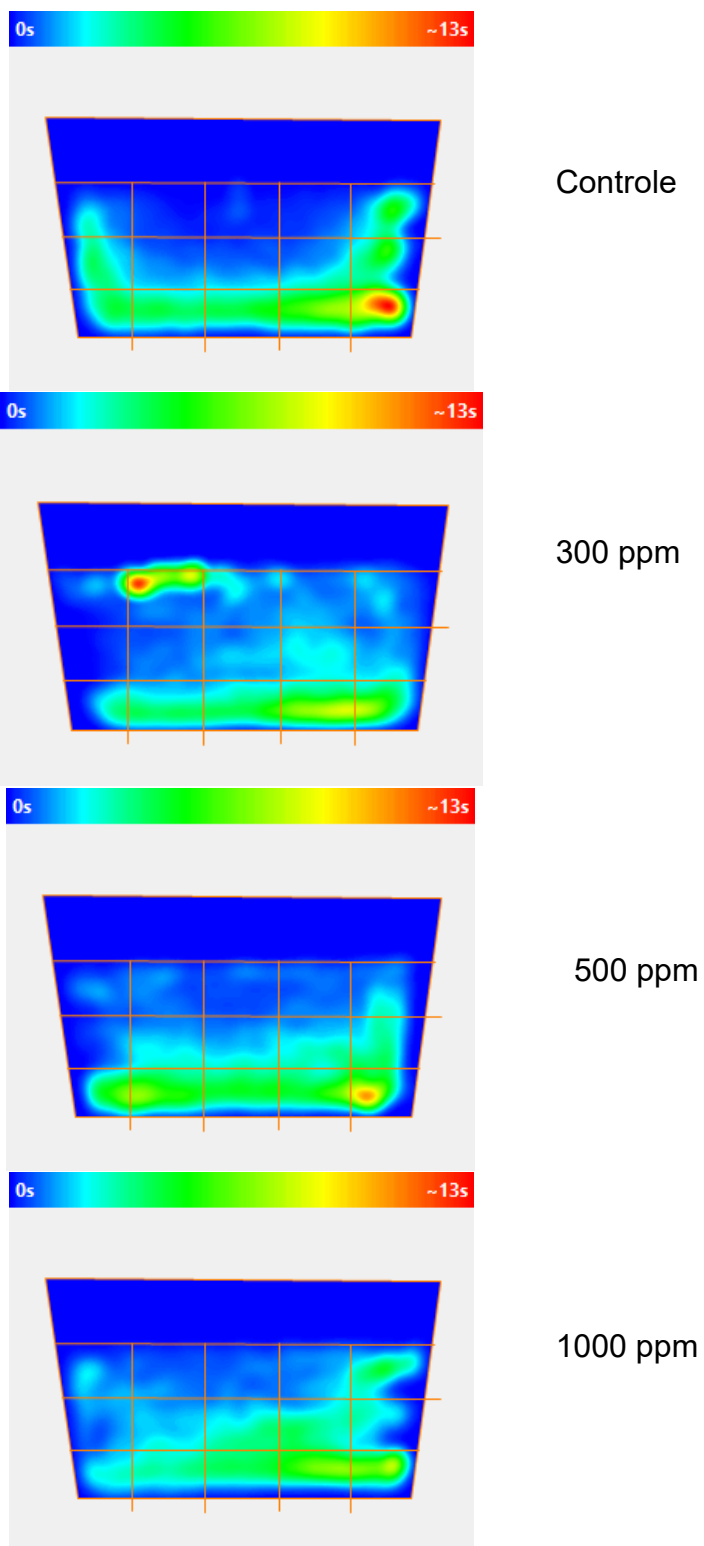
**Figura 3. Avaliação do efeito do fluoreto de sódio nos grupos Fluoreto de sódio (300ppm), Fluoreto de sódio (500ppm) e Fluoreto de sódio (1000ppm) sobre o tempo de permanência (A) e número de entradas (B) na zona meio do aparato Open Tank.** \* $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

Quando avaliado a zona fundo, foram avaliados o tempo de permanência, distância percorrida e o número de entradas nesta área. Apenas o grupo Fluoreto de sódio (300ppm) apresentou uma alteração, apresentando uma diminuição significativa deste grupo em relação ao controle no número de entradas na zona ( $p=0,0011$ ) (Figura 4).



**Figura 4. Avaliação do efeito do fluoreto de sódio nos grupos Fluoreto de sódio (300ppm), Fluoreto de sódio (500ppm) e Fluoreto de sódio (1000ppm) sobre o tempo de permanência (A), distância percorrida (B) e número de entradas (C) na zona fundo do aparato Open Tank. \* $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).**

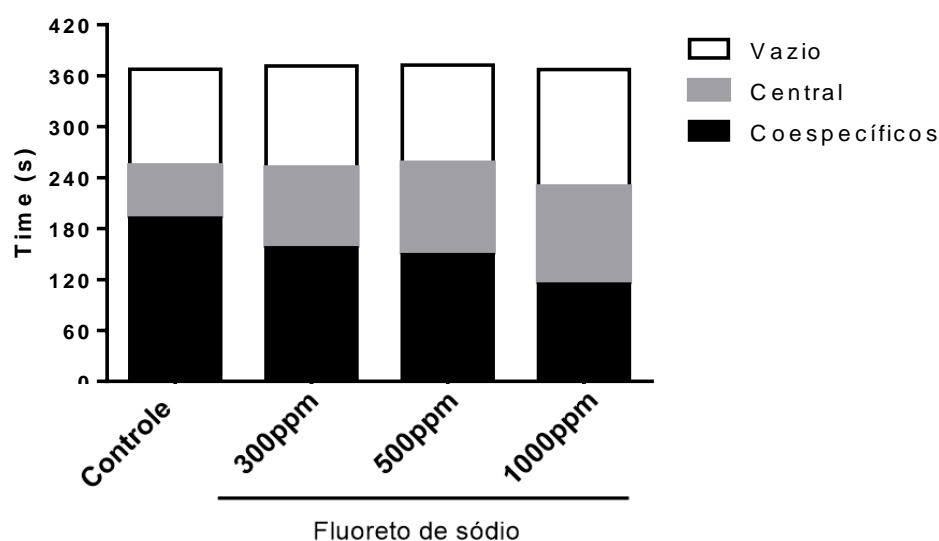
Para melhor visualização, a alteração do perfil comportamental exploratório do peixe-zebra exposto ao NaF em diferentes concentrações durante a gravação podem ser visualizadas nas imagens que ilustram o tempo médio de permanência em cada zona (Figura 5).



**Figura 5. Avaliação do efeito do fluoreto de sódio nos grupos Fluoreto de sódio (300ppm), Fluoreto de sódio (500ppm) e Fluoreto de sódio (1000ppm) sobre o tempo de permanência.** Conforme escala de coloração, a intensidade indica o tempo de permanência em cada um dos compartimentos avaliados. Os dados foram obtidos pelo software ANY-maze®, Stoelting CO, USA.

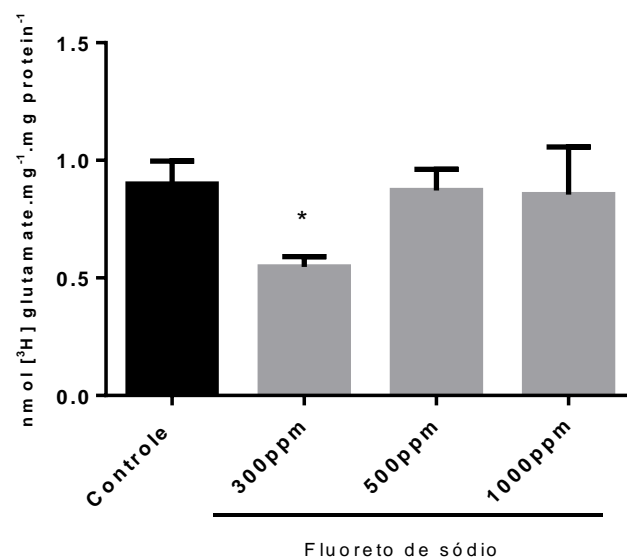


Ao avaliar a interação social, utilizando outro aparato, foi observado uma redução significativa do tempo de permanência no compartimento coespecífico para o grupo Fluoreto de sódio 1000 ppm com relação ao grupo controle ( $p=0,015$ ). Quando avaliados os compartimentos centro e vazio, não foram verificadas alterações significativas. (Fig. 6).



**Figura 6.** Avaliação do efeito do fluoreto de sódio nos grupos Fluoreto de sódio (300ppm), Fluoreto de sódio (500ppm) e Fluoreto de sódio (1000ppm) sobre o tempo de permanência no aparato de Preferência Social. \* $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

Uma vez que a exposição prolongada ao NaF foi capaz de promover alterações exploratórias e de interação social do peixe-zebra, o próximo passo foi investigar a funcionalidade dos transportadores de glutamato sobre cérebro de peixes-zebra expostos ao NaF através da captação de glutamato. Foi observado uma diminuição na função desses transportadores apenas no grupo exposto ao NaF na concentração de 300ppm ( $p=0,0015$ ). (Fig. 7).



**Figura 7. Efeito do fluoreto de sódio sobre a funcionalidade dos transportadores de glutamato em cérebro total de peixe-zebra.** Os resultados representam média  $\pm$  desvio padrão. Os valores estão expressos em nmol de glutamato[H]<sup>3</sup>. min<sup>-1</sup>.mg de proteína<sup>-1</sup>. \*p<0,05 em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida de Post-hoc de Tukey)

## 5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, buscamos avaliar se a exposição ao NaF em diferentes concentrações foi capaz de alterar o comportamento dos animais. Alguns parâmetros permitem avaliar o comportamento do tipo que causa ansiedade e que reduz ansiedade bem como a distância percorrida de nado, velocidade média e tempo de preferência em determinadas regiões do aquário. Quando avaliada a distância percorrida e a velocidade média, não encontramos diferenças significativas nos grupos em relação aos animais não tratados com NaF. Tais resultados excluem o possível prejuízo causado pelo NaF sobre o sistema locomotor, o que poderia comprometer os resultados relacionados à exploração do aparato nas distintas zonas do aquário.

O *open field* é o teste mais comumente utilizado para avaliar o comportamento em modelos animais. Geralmente é realizado com ratos ou camundongos experimentais a fim de mensurar comportamentos que variam da atividade locomotora geral a comportamentos emocionais relacionados à ansiedade. Tais dados permitem ao pesquisador mensurar comportamentos que variam desde a atividade locomotora geral a comportamentos emocionais relacionados à ansiedade (Lynn e Brown, 2009; Seibenhener e Wooten, 2015; Kraeuter et al., 2019).

Semelhante ao *open field* utilizado para roedores, o *open tank* está emergindo como uma ferramenta para análise comportamental em peixes-zebra. Este teste consiste em avaliar a atividade exploratória/locomotora com base na tendência deste animal explorar inicialmente o fundo do aquário e gradualmente nadar para as áreas superiores. Este aparato é importante também para o estudo da ansiedade no peixe-zebra, o qual determina a ansiedade do animal pela maior busca do fundo; enquanto uma ansiedade reduzida levaria a busca pelo topo do aquário (Levin et al., 2007; Egan et al., 2009; Cachat et al., 2010 ; Rosemberg et al., 2011).

O aquário foi dividido virtualmente em topo, meio e fundo, onde apenas o grupo Fluoreto de sódio (300ppm) obteve alterações significativas em alguns parâmetros. Em relação ao tempo de permanência no topo, o grupo NaF (300ppm) apresentou preferência significativa em permanecer no topo do aquário, sendo que este perfil está associado a um comportamento tipo ansiolítico. O mesmo grupo apresentou

uma diminuição tanto no número de entradas como também no tempo de latência para a zona topo para este grupo. Na literatura, um menor tempo de latência e menor tempo gasto na parte superior para entrar na área superior, bem como a manifestação de movimentos irregulares e congelamento indicam aumento da ansiedade (Barcellos et al., 2007; Levin et al., 2007). Assim, nossos achados indicam que a exposição ao NaF a 300 ppm promovem um perfil tipo ansiolítico no peixe-zebra.

O comportamento vertical do peixe-zebra no *open tank* representa sua tendência a explorar gradualmente as áreas superiores quando submetido a novos aparatos, o que pode refletir o comportamento de habituação. À medida que o peixe se adapta ao novo ambiente, geralmente ocorre um aumento na exploração, refletido pelo aumento da locomoção, tempo gasto no topo e mais entradas na parte superior do tanque. Esses parâmetros são indicativos de níveis reduzidos de ansiedade (Levin et al., 2007; Cachat et al., 2010; Mathur e Guo, 2011).

Nossos resultados demonstraram que os peixes do grupo Fluoreto de sódio 300ppm exibiram aumentos significativos do tempo gasto no topo, consistente com o comportamento de habituação. Esses dados corroboram com achados anteriores que demonstraram uma resposta rápida de habituação de peixe-zebra no *open tank* (Gerlai et al., 2000; Egan et al., 2009; Wong et al., 2010).

Quando os animais foram avaliados na zona meio, percebemos que o grupo NaF (300ppm) permaneceu menos tempo nesta área, uma vez que a preferência foi manter-se no topo, concomitante com um menor número de entradas na zona. Pode-se afirmar que neste grupo, a área do meio foi usada principalmente para transições verticais, onde os animais praticamente não exploraram (Rosemberg et al., 2011). Em relação a zona fundo, nenhum grupo apresentou alteração significativa no tempo de permanência e na distância percorrida. Somente no parâmetro número de entradas, percebemos que o grupo NaF (300ppm) novamente obteve uma diminuição.

Este aparato é um excelente teste para a triagem de medicamentos, pois o comportamento semelhante à ansiedade pode ser modulado por agentes ansiogênicos e ansiolíticos (López-Patiño et al., 2008; Wong et al., 2010). O comportamento do peixe-zebra pode ser um indicador dos efeitos de poluentes e outros agentes químicos relacionados em um ambiente (MacPhail et al., 2009). Os efeitos de drogas como

etanol, nicotina, morfina, anfetamina, benzodiazepínicos e cocaína já foram testados anteriormente em peixe-zebra (Gerlai et al., 2006; Ninkovic e Bally-Cuif, 2006; Bretaud et al., 2007; Levin et al., 2007; Bencan et al., 2009; Rosemberg et al., 2012) assim como diferentes substâncias tóxicas (Pereira et al., 2012; Vignet et al., 2014).

Em relação à exposição ao NaF, Mukhopadhyay e Chattopadhyay (2015) demonstraram que esta substância é capaz de afetar o comportamento do peixe-zebra, os quais foram divididos em três grupos expostos a 7,5, 15 e 30 ppm de NaF por 30 dias. Os peixes expostos a NaF mostraram hiperatividade, natação rápida com padrão vertical e atividade frequente de superfície. Pelo contrário, os peixes controle mantiveram o perfil locomotor padrão e, na maioria das vezes, permaneciam próximos à superfície inferior do aquário com natação lenta e horizontal na maior parte do tempo. As atividades de superfície e os comportamentos de inquietação estão relacionados à condição hipóxica do organismo sob estresse tóxico (Pandey et al., 2005).

Quanto à preferência social, a exposição prolongada do NaF influenciou o zebrafish no que se refere ao teste de interação social. A preferência em associar-se a outros peixes é inata no peixe-zebra, os quais formam cardumes desde os estágios iniciais da vida. A busca por um comportamento tipicamente grupal é representado pelo compartimento coespecífico do aquário, enquanto que o compartimento vazio retrata uma atitude aversiva ao grupo (Buske et al., 2011; Pagnussat et al., 2013). Observa-se que os peixes manifestaram um perfil de evitar a interação social devido a redução do tempo no compartimento coespecífico, indicando a diminuição da busca pelo grupo.

Devido a escassa literatura ao avaliar a exposição do NaF em peixe-zebra, podemos relacionar com outros modelos experimentais, como roedores. Foi demonstrado que a exposição ao NaF diminuiu a atividade locomotora e exploratória em ratos (Ekambaram e Paul, 2001; Bartos et al., 2015; Adedara et al., 2017) além de prejuízos na aprendizagem e na memória (Niu et al., 2009; Liu et al., 2011; Liu et al., 2014; Yan et al., 2016).

Adedara et al. (2017) avaliaram parâmetros comportamentais utilizando o teste *open field* em ratos expostos ao NaF isoladamente em água potável a 15 mg / L e observaram uma diminuição significativa na velocidade máxima e distância total percorrida, enquanto o tempo imóvel aumentou comparado com o controle. No entanto,

os ratos co-administrados com taurina, mostraram uma reversão significativa do desempenho locomotor comparado com os ratos expostos ao NaF isoladamente. Além disso, a taurina melhorou o perfil exploratório em ratos expostos ao NaF. Estas observações sugerem uma toxicidade induzida por NaF, que pode ser devido à coordenação interrompida entre junções nervosas e musculares em ratos expostos (Aderara et al., 2017). Esses achados corroboram com Ekambaram e Paul (2001) que mostraram que a exposição ao NaF resultou na supressão da atividade locomotora espontânea de ratos expostos a concentrações muito altas de NaF (500 ppm em água potável) por 60 dias.

O NaF pode atravessar a barreira da placenta e se difundir no sangue do cordão umbilical, com faixas de 60% a 91%, sugerindo sua acessibilidade para bebês (Faraji et al., 2014; Gupta et al., 2015). Além disso, esta substância acumula-se em diferentes regiões do cérebro, causando prejuízo na aprendizagem e na memória (Liu et al., 2014). Diversos estudos em roedores demonstraram que a exposição materna ao fluoreto durante a gestação e lactação podem influenciar a capacidade de aprendizado e memória da prole (Bartos et al., 2018; Chen et al., 2018; Sun et al., 2018; Wang et al., 2018).

Foi demonstrado que o NaF *in vitro* causou neurotoxicidade principalmente dirigida a neurônios do hipocampo, relacionados ao aprendizado e memória (Zhang et al., 2008). O acúmulo de NaF em diferentes regiões do cérebro, principalmente no hipocampo, juntamente com a alteração de processos bioquímicos e celulares afeta a síntese de neurotransmissores, causando um desequilíbrio nos níveis de glutamato, alterações nas atividades enzimáticas, expressão de receptores e plasticidade neuronal (Bhatnagar et al., 2006; Reddy et al., 2013). Além disso, o fluoreto inibiu as expressões proteicas e de mRNA do receptor de insulina no hipocampo e no bulbo olfatório de camundongos, sugerindo que esses achados podem afetar em parte a capacidade de aprendizado e memória em ratos (Yuan et al., 2019). Em adição, Chen et al. (2018) observou que o NaF resultou em alterações sinápticas *in vivo* e *in vitro*, como diminuição da densidade de espinhas dendríticas e a expressão de proteínas sinapsofisinas das sinapses (SYN) e proteína 95 de densidade pós-sináptica (PSD-95) no hipocampo, apontando para um déficit cognitivo induzido por NaF associado ao

comprometimento sináptico. O PSD-95 tem um papel crucial na neurotransmissão, plasticidade sináptica e morfogênese da coluna dendrítica durante o neurodesenvolvimento. Já o SYN é um marcador pré-sináptico e seu nível de expressão reflete com precisão o número e a densidade das sinapses, refletindo o status da sinaptogênese (Zhang et al., 2016; Coley e Gao, 2018).

Yang et al. (2018) demonstraram que o fluoreto ativa a microglia, secreta fatores inflamatórios, através das vias de sinalização ERK / MAPK e P38 / MAPK e influencia a plasticidade dos neurônios sinápticos no hipocampo de ratos. A micróglia ativada leva a uma liberação de altos níveis de quimiocinas, citocinas, interferons e prostaglandinas inflamatórias, bem como uma variedade de aminoácidos excitotóxicos, como o glutamato. A produção sustentada de citocinas inflamatórias pela microglia pode regular a plasticidade e a função sináptica e desencadear a morte celular neuronal (Kaindl et al., 2012; Miyamoto et al., 2013; Strunecka et al., 2018). A neuroinflamação crônica induzida pela micróglia demonstrou uma redução na plasticidade sináptica e um aumento da secreção de fatores inflamatórios e a apoptose celular no hipocampo de ratos (Yang et al., 2018).

A neurotoxicidade induzida por NaF está fortemente associada à morte e perda neuronais (Sharma et al., 2014) e a apoptose desempenha um papel indispensável neste processo (Song et al., 2018). Zhou et al. (2019) demonstraram que a exposição crônica ao NaF aumenta os níveis de proteínas da apoptose e suprime a autofagia no hipocampo de ratos filhotes, contribuindo para neurotoxicidade. Da mesma forma, a exposição crônica a 50 mg/L de NaF por seis meses prejudicou as habilidades de aprendizado e memória e induziu apoptose neuronal em ratos adultos (Liu et al., 2011).

Os efeitos adversos na capacidade cognitiva causados por altas concentrações de fluoreto na água potável é corroborado por diversos estudos epidemiológicos (Wang et al., 2007; Ding et al., 2011; Poureslami et al., 2011; Trivedi et al., 2012; Bashash et al., 2017). A revisão sistemática e metanálise de Choi et al. (2012) analisou 27 estudos publicados ao longo de 22 anos e os autores sugeriram uma associação inversa entre alta exposição ao flúor e inteligência. As crianças que moravam em áreas com alta exposição ao fluoreto apresentaram escores de quociente

de inteligência (QI) mais baixos do que aquelas que moravam em áreas de baixa exposição ou controle. Tais resultados apontam que a neurotoxicidade do fluoreto afeta o desenvolvimento do cérebro em exposições muito abaixo daquelas que podem causar toxicidade em adultos (Choi et al., 2012).

Em nosso trabalho o grupo NaF (300ppm) demonstrou maior preferência em permanecer no topo do aquário, caracterizando um comportamento menos ansioso. Ao mesmo tempo, observamos uma diminuição na funcionalidade dos transportadores de glutamato no referido grupo. Em contrapartida, Li et al. (2019) avaliaram o efeito da exposição ao NaF no comportamento semelhante à ansiedade e à depressão em camundongos submetidos ao NaF por 90 dias, 120 dias e 150 dias. Foi observado que a exposição ao fluoreto pode levar a comportamentos relacionados à ansiedade e à depressão em camundongos adultos; especialmente nos animais expostos por 120 dias ao NaF. Os autores também avaliaram os transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs), os quais são relacionados a distúrbios neurológicos, porém não foram observadas alterações significativas nos níveis de expressão do gene em comparação com os ratos controle (Liguz-Leczna e Skangiel-Kramska, 2007).

O fluoreto acarreta alterações na homeostase do glutamato e, conseqüentemente de seus receptores, os quais são encontrados em abundância tanto no cérebro quanto no pâncreas, pulmão, coração, células endoteliais, células imunes e ovários. De fato, o glutamato é o neurotransmissor mais abundante no SNC e é responsável pela atenção e aprendizado, porém ao mesmo tempo é o mais neurotóxico. Uma das maneiras mais importantes de controlar as concentrações de glutamato no sistema nervoso é através dos transportadores de glutamato (Corona e Tapia, 2005; Pereira et al., 2011; Blaylock et al., 2014). De modo semelhante aos nossos dados, Pereira et al. (2011) demonstraram que a exposição subcrônica ao NaF causou uma redução significativa nos níveis de transportadores de glutamato em roedores expostos a 100 ppm durante 30 dias.

Chen et al. (2017) observaram que concentrações crescentes de NaF *in vitro* reduziram a liberação de glutamato das células Neuro-2A em comparação com as células controle. Da mesma forma, a expressão do receptor de glutamato NMDA foi diminuída com o aumento da concentração de NaF, uma tendência semelhante à



observada para o glutamato. Além disso, foram observadas alterações estruturais como o desaparecimento de sinapses, aglutinação mitocondrial, formação de vacúolos e edema celular. Considerando que os neurônios afetados são incapazes de transmitir sinais para outros, é possível que a exposição excessiva ao NaF possa influenciar as funções dos axônios e limitar a secreção e a transmissão de neurotransmissores, como o glutamato, afetando a função neuronal (Flora et al., 2012; Chen et al., 2017).

Sabe-se que os receptores de glutamato participam da formação do aprendizado e da memória (Cercato et al., 2014). A exposição a 100mg/L de NaF através do sangue do cordão umbilical e do leite materno prejudicou a capacidade de aprendizado e memória dos filhotes de camundongos, refletido pelos resultados dos testes de campo aberto e labirinto de braço radial. Em adição, o NaF reduziu a expressão de mRNA das subunidades dos receptores de glutamato no hipocampo, em especial o AMPA (GluR2) (Sun et al., 2018). Corroborando com esses achados, Yang et al. (2018) observaram uma redução da expressão dos receptores ionotrópicos de glutamato (subunidades GluR2 e NMDAR2 $\beta$ ) no hipocampo de ratos expostos cronicamente a 120 ppm NaF por doze semanas indicando uma relação com déficits cognitivos.

A redução na funcionalidade dos transportadores de glutamato e o comportamento do tipo ansiolítico em peixes-zebras expostos a 300ppm de NaF sugerem que a alteração na homeostase do glutamato pode ser um dos mecanismos pelos quais o NaF influencia o comportamento desses animais.

## 6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que o modelo de exposição prolongada de NaF foi capaz de alterar o sistema glutamatérgico e parâmetros comportamentais em peixe-zebra. Os transportadores de glutamato demonstraram ser sensíveis ao NaF na concentração de 300ppm, onde obteve-se uma redução da funcionalidade de transporte. Através dos resultados do teste *Open tank* podemos concluir que os peixes expostos a 300ppm de NaF refletiram um comportamento do tipo ansiolítico e isso pode estar relacionado com a disfunção dos transportadores glutamatérgicos. Já em relação ao comportamento de interação social, verificamos uma redução de interação social para a concentração mais elevada de NaF.

Este foi o primeiro estudo a avaliar o efeito glutamatérgico em peixes-zebra expostos cronicamente ao NaF. Os achados do presente estudo evidenciam a importância dos efeitos neurotóxicos do NaF, o qual é amplamente utilizado na área odontológica e consumido na forma de água potável, sustentando a relevância da melhor compreensão dos mecanismos envolvidos a fim de gerar benefícios à população.

## REFERÊNCIAS

Adedara IA, Abolaji AO, Idris UF, Olabiyi BF, Onibiyo EM, Ojuade TD, Farombi EO. Neuroprotective influence of taurine on fluoride-induced biochemical and behavioral deficits in rats. *Chem Biol Interact.* 2017;261:1-10.

Aravind A, Dhanya RS, Narayan A, Sam G, Adarsh VJ, Kiran M. Effect of fluoridated water on intelligence in 10-12-year-old school children. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2016; 6(Suppl 3):S237–S242.

Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:4155–4160.

Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, Bedell JA, McPherson JD, Johnson SL. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* 2000;10:1351-1358.

Barcellos LJG, Ritter F, Kreutz LC, Quevedo RM, Bolognesi da Silva L, Bedin AC, et al. Whole-body cortisol increases after direct and visual contact with a predator in zebrafish *Danio rerio*. *Aquaculture* 2007;272:774–8.

Bartos M, Gumilar F, Bras C, Gallegos CE, Giannuzzi L, Cancela LM, Minetti A. Neurobehavioural effects of exposure to fluoride in the earliest stages of rat development. *Physiol Behav.* 147: 205-12, 2015.

Bartos M, Gumilar F, Gallegos CE, Bras C, Dominguez S, Mónaco N, Esandi MDC, Bouzat C, Cancela LM, Minetti A. Alterations in the memory of rat offspring exposed to low levels of fluoride during gestation and lactation: Involvement of the  $\alpha 7$  nicotinic receptor and oxidative stress. *Reprod Toxicol.* 2018; 81:108-114.

Bashash M, Thomas D, Hu H, Martinez-Mier EA, Sanchez BN, Basu N, Peterson KE, Ettinger AS, Wright R, Zhang Z, Liu Y, Schnaas L, Mercado-García A, Téllez-Rojo MM, Hernández-Avila M. Prenatal Fluoride Exposure and Cognitive Outcomes in Children at 4 and 6-12 Years of Age in Mexico. *Environ Health Perspect.* 2017; 125(9):097017.

Behra M, Cousin X, Bertrand C, Vonesch JL, Biellmann D, Chatonnet A, Strähle U. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nat Neurosci.* 2002;5:111-118.

Bencan Z, Sledge D, Levin ED. Buspirone, chlordiazepoxide and diazepam effects in a zebrafish model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009; 94(1):75-80.

Bhatnagar M, Rao P, Saxena A, Bhatnagar R, Meena P, Barbar S, Chouhan A, Vimal S. Biochemical changes in brain and other tissues of young adult female mice from fluoride in their drinking water, *Fluoride* 39 (2006) 280–284.

Blank M, Guerim LD, Cordeiro RF, Vianna MR. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2009;92:529-534.

Blaser R, Gerlai R. Behavioral phenotyping in zebrafish: comparison of three behavioral quantification methods. *Behav Res Methods.* 2006; 38(3):456-69.

Blaylock RL. Excitotoxicity: a possible central mechanism in fluoride neurotoxicity. *Fluoride.* 2004;37:301–314.

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. *Dev Dyn.* 2004;230:481-493.

Bouvier G, Bidoret C, Casado M, Paoletti P. Presynaptic NMDA receptors: Roles and rules. *Neuroscience.* 2015;311:322–340.

Bretaud S, Li Q, Lockwood BL, Kobayashi K, Lin E, Guo S. A choice behavior for morphine reveals experience-dependent drug preference and underlying neural substrates in developing larval zebrafish. *Neuroscience.* 2007; 146(3):1109-16.

Broughton RE, Milam JE, Roe BA. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA. *Genome Res.* 2001;11:1958-1967.

Buske C, Gerlai R. Shoaling develops with age in Zebrafish (*Danio rerio*). *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011;35:1409–1415.

Cachat J, Stewart A, Grossman L, Gaikwad S, Kadri F, Chung KM, Wu N, Wong K, Roy S, Suci C, Goodspeed J, Elegante M, Bartels B, Elkhayat S, Tien D, Tan J, Denmark A, Gilder T, Kyzar E, Dileo J, Frank K, Chang K, Utterback E, Hart P, Kalueff AV. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nat Protoc.* 2010;5:1786–1799.

Castro TFD, Paiva IM, Carvalho AFS, Assis IL, Palmieri MJ, Andrade-Vieira LF, Marcussi S, Solis-Murgas LD. Genotoxicity of spent pot liner as determined with the zebrafish (*Danio rerio*) experimental model. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2018;25:11527-11535.

Cercato MC, Colettis N, Snitcofsky M, Aguirre AI, Kornisiuk EE, Baez MV, Jerusalinsky DA. Hippocampal NMDA receptors and the previous experience effect on memory. *J Physiol Paris.* 2014; 108(4-6):263-9.

Choi AL, Sun G, Zhang Y, Grandjean P. Developmental fluoride neurotoxicity: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect*. 2012; 120(10):1362-8.

Choi AL, Zhang Y, Sun G, Bellinger DC, Wang K, Yang XJ, Li JS, Zheng Q, Fu Y, Grandjean P. Association of lifetime exposure to fluoride and cognitive functions in Chinese children: a pilot study. *Neurotoxicol Teratol*. 2015;47:96-101.

Chen L, Ning H, Yin Z, Song X, Feng Y, Qin H, Li Y, Wang J, Ge Y, Wang W. The effects of fluoride on neuronal function occurs via cytoskeleton damage and decreased signal transmission. *Chemosphere*. 2017; 185:589-594

Chen J, Niu Q, Xia T, Zhou G, Li P, Zhao Q, Xu C, Dong L, Zhang S, Wang A. ERK1/2-mediated disruption of BDNF-TrkB signaling causes synaptic impairment contributing to fluoride-induced developmental neurotoxicity. *Toxicology*. 2018;410:222-230.

Coley AA, Gao WJ. PSD95: A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018; 82:187-194

Corona JC, Tapia R. Mecanismos de Neurodegeneración. *Mensaje Bioquímico*. 2005; 29: 17-28.

Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*. 2001;65:1-105.

Dec K, Łukomska A, Maciejewska D, Jakubczyk K, Baranowska-Bosiacka I, Chlubek D, Wąsik A, Gutowska I. The Influence of Fluorine on the Disturbances of Homeostasis in the Central Nervous System. *Biol Trace Elem Res*. 2017; 177:224-234.

Ding Y, YanhuiGao, Sun H, Han H, Wang W, Ji X, Liu X, Sun D. The relationships between low levels of urine fluoride on children's intelligence, dental fluorosis in endemic fluorosis areas in Hulunbuir, Inner Mongolia, China. *J Hazard Mater*. 2011; 186(2-3):1942-6

Domingos PA, Ricci-Donato HA, Russi AKFD. Riscos do uso do Flúor Sistêmico. *J Dent Res*. 2018;6:86-90.

Ebarasi L, Oddsson A, Hultenby K, Betsholtz C, Tryggvason K. Zebrafish: a model system for the study of vertebrate renal development, function, and pathophysiology. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2011;20:416-424.

Edwards JG, Michel WC. Odor-stimulated glutamatergic neurotransmission in the zebrafish olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 2002;454:294-309.

Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavello PR, Elegante MF, Elkhayat SI, Bartels BK, Tien AK, Tien DH, Mohnot S, Beeson E, Glasgow E, Amri H, Zukowska Z, Kalueff AV. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav Brain Res*. 2009; 205(1):38-44

Ekambaram P, Paul V. Calcium preventing locomotor behavioral and dental toxicities of fluoride by decreasing serum fluoride level in rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2001; 9(4):141-146.

El-Iethy HS, Kamel MM, Shaheed IB. Neurobehavioral toxicity produced by sodium fluoride in drinking water of laboratory rats. *J Am Sci.* 2010;6:54–63.

Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature.* 1995;375:599–603.

Faraji H, Mohammadi AA, Akbari-Adergani B, Vakili Saatloo N, Lashkarboloki G, Mahvi AH. Correlation between Fluoride in Drinking Water and Its Levels in Breast Milk in Golestan Province, Northern Iran. *Iran J Public Health.* 2014; 43(12):1664-8.

Flora SJ, Mittal M, Pachauri V, Dwivedi N. A possible mechanism for combined arsenic and fluoride induced cellular and DNA damage in mice. *Metallomics.* 2012; 4(1):78-90.

Froehlicher M, Liedtke A, Groh KJ, Neuhauss SC, Segner H, Eggen RI. Zebrafish (*Danio rerio*) neuromast: promising biological endpoint linking developmental and toxicological studies. *Aquat Toxicol.* 2009;95:307-319.

Furuta A, Martin LJ, Lin CL, Dykes-Hoberg M, Rothstein JD. Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporter 3 and 4. *Neuroscience.* 1997a;81:1031-1042.

Furuta A, Rothstein JS, Martin LJ. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci.* 1997b;17:8363–8375.

Gao Q, Liu YJ, Guan ZZ. Decreased learning and memory ability in rats with fluorosis: increased oxidative stress and reduced cholinesterase activity in the brain. *Fluoride.* 2009;42:266–274.

Gasic GP, Hollmann M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu Rev Physiol.* 1994;54:507-536.

Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav.* 2000;67:773-782.

Gerlai R, Lee V, Blaser R. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacol Biochem Behav.* 2006;85:752-761.

Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol*. 2004;4:504-512.

Grandjean P, Landrigan PJ. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *Lancet Neurol*. 2014;13:330–338.

Grosell M, Wood CM. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *J Exp Biol*. 2002;205:1179-1188.

Guan ZZ, Wang YN, Xiao KQ, Dai DY, Chen YH, Liu JL, Sindelar P, Dallner G. Influence of chronic fluorosis on membrane lipids in rat brain. *Neurotoxicol Teratol*. 1998;20:537–542.

Guo S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes Brain Behav*. 2004;3:63-74.

Gupta P, Gupta N, Meena K, Moon NJ, Kumar P, Kaur R. Concentration of Fluoride in Cow's and Buffalo's Milk in Relation to Varying Levels of Fluoride Concentration in Drinking Water of Mathura City in India- A Pilot Study. *J Clin Diagn Res*. 2015; 9(5):LC05-7..

Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res*. 1999;103:1-11.

Jianjie C, Wenjuan X, Jinling C, Jie S, Ruhui J, Meiyan L. Fluoride caused thyroid endocrine disruption in male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol*. 2016;171:48-58.

Kaindl AM, Degos V, Peineau S, Gouadon E, Chhor V, Loron G, Le Charpentier T, Josserand J, Ali C, Vivien D, Collingridge GL, Lombet A, Issa L, Rene F, Loeffler JP, Kavelaars A, Verney C, Mantz J, Gressens P. Activation of microglial N-methyl-D-aspartate receptors triggers inflammation and neuronal cell death in the developing and mature brain. *Ann Neurol*. 2012; 72(4):536-49.

Kaslin J, Panula P. Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol*. 2001;440:342-377.

Kim YJ, Nam RH, Yoo YM, Lee CJ. Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci Lett*. 2004;355:29-32.

Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. *Methods Mol Biol*. 2019;1916:99-103.

Kucenas S, Li Z, Cox JA, Egan TM, Voigt MM. Molecular characterization of the zebrafish P2X receptor subunit gene family. *Neuroscience*. 2003;121:935-945..

Lele Z, Krone PH. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnol Adv.* 1996;14:57-72.

Levin ED, Bencan Z, Cerutti DT. Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiol Behav.* 2007;90:54-58.

Li X, Zhang J, Niu R, Manthari RK, Yang K, Wang J. Effect of fluoride exposure on anxiety- and depression-like behavior in mouse. *Chemosphere.* 2019; 215:454-460.

Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet.* 2007;8:353-367.

Liguz-Lecznar M, Skangiel-Kramska J. Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2007;67(3):207-18. Review.

Liu YJ, Gao Q, Wu CX, Guan ZZ. Alternations of nAChRs and ERK1/2 in the brains of rats with chronic fluorosis and their connections with the decreased capacity of learning and memory. *Toxicol Lett.* 2010;192:324–329.

Liu YJ, Guan ZZ, Gao Q, Pei JJ. Increased level of apoptosis in rat brains and SH-SY5Y cells exposed to excessive fluoride—a mechanism connected with activation of JNK phosphorylation. *Toxicol Lett.* 2011;204:183–189.

Liu F, Ma J, Zhang H, Liu P, Liu YP, Xing B, Dang YH. Fluoride exposure during development affects both cognition and emotion in mice. *Physiol Behav.* 2014; 124:1-7.

López-Patiño MA, Yu L, Cabral H, Zhdanova IV. Anxiogenic effects of cocaine withdrawal in zebrafish. *Physiol Behav.* 2008; 93(1-2):160-71.

Lynn DA, Brown GR. The ontogeny of exploratory behavior in male and female adolescent rats (*Rattus norvegicus*). *Dev Psychobiol.* 2009; 51(6):513-20

Macnab LT, Pow DV. Expression of the exon 9-skipping form of EAAT2 in astrocytes of rats. *Neuroscience.* 2007;150:705-711.

MacPhail RC, Brooks J, Hunter DL, Padnos B, Irons TD, Padilla S. Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. *Neurotoxicology.* 2009; 30(1):52-8.

Mathur P, Guo S. Differences of acute versus chronic ethanol exposure on anxiety-like behavioral responses in zebrafish. *Behav Brain Res.* 2011; 219(2):234-9.

Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr.* 2000;130:1007S-1015S.



Miyamoto A, Wake H, Moorhouse AJ, Nabekura J. Microglia and synapse interactions: fine tuning neural circuits and candidate molecules. *Front Cell Neurosci.* 2013 May 15;7:70.

Mukhopadhyay D, Priya P, Chattopadhyay A. Sodium fluoride affects zebrafish behaviour and alters mRNA expressions of biomarker genes in the brain: Role of Nrf2/Keap1. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2015;40:352-359.

Mullenix PJ, Denbesten PK, Schunior A, Kernan WJ. Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. *Neurotoxicol Teratol.* 1995;17:169–177.

Narayanaswamy M, Piler MB. Effect of maternal exposure of fluoride on biometals and oxidative stress parameters in developing CNS of rat. *Biol Trace Elem Res.* 2010;133:71–82.

National Research Council (NRC). *Fluoride in Drinking Water: a Scientific Review of EPA's Standards* National Academies Press. Washington, DC: The National Academies Press; 2006.

Ninkovic J, Bally-Cuif L. The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. *Methods.* 2006; 39(3):262-74.

Niu R, Sun Z, Cheng Z, Li Z, Wang J. Decreased learning ability and low hippocampus glutamate in offspring rats exposed to fluoride and lead. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2009; 28(2):254-8.

Olney JW, Wozniak DF, Jevtovic-Todorovic V, Ikonomidou C.. Glutamate signaling and the fetal alcohol syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2001;7:267-275.

Pagnussat N, Piato AL, Schaefer IC, Blank M, Tamborski AR, Guerim LD, Bonan CD, Vianna MR, Lara DR. One for all and all for one: the importance of shoaling on behavioral and stress responses in zebrafish. *Zebrafish.* 2013; 10(3):338-42.

Pandey S, Kumar R, Sharma S, Nagpure NS, Srivastava SK, Verma MS. Acute toxicity bioassays of mercuric chloride and malathion on air-breathing fish *Channa punctatus* (Bloch). *Ecotoxicol Environ Saf.* 2005; 61(1):114-20

Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14:383–400.

Pereira M, Dombrowski PA, Losso EM, Chioca LR, Da Cunha C, Andreatini R. Memory impairment induced by sodium fluoride is associated with changes in brain monoamine levels. *Neurotox Res.* 2011; 19(1):55-62.

Pereira VM, Bortolotto JW, Kist LW, Azevedo MB, Fritsch RS, Oliveira Rda L, Pereira TC, Bonan CD, Vianna MR, Bogo MR. Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology*. 2012; 33(3):469-75.

Peterson GL. A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which Is More Generally Applicable. *Anal Biochem*. 1977;83:346–356.

Poureslami HR, Horri A, Garrusi B. A comparative study of the IQ of children age 7-9 in a high and a low fluoride water city in Iran. *Fluoride* 2011; 44(3):163–167.

Pow DV. Amino acids and their transporters in the retina. *Neurochem Int*. 2001;38:463-484.

Qiu S, Li XY, Zhuo M. Post-translational modification of NMDA receptor GluN2B subunit and its roles in chronic pain and memory. *Semin Cell Dev Biol*. 2011;22:521–529.

Reddy YP, Tiwari SK, Shaik AP, Alsaeed A, Sultana A, Reddy PK. Effect of sodium fluoride on neuroimmunological parameters, oxidative stress and antioxidative defenses. *Toxicol Mech Methods*. 2014; 24(1):31-6.

Regan MC, Romero-Hernandez A, Furukawa H. A structural biology perspective on NMDA receptor pharmacology and function. *Curr Opin Struct Biol*. 2015;33:68–75.

Rico EP, Senger MR, Fauth Mda G, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci*. 2003;73:2071-2082.

Rico EP, de Oliveira DL, Rosemberg DB, Mussulini BH, Bonan CD, Dias RD, Wofchuk S, Souza SDO, Bogo MR. Expression and functional analysis of Na(+)-dependent glutamate transporters from zebrafish brain. *Brain Res Bull*. 2010;81:517–523.

Riedel G, Platt B, Micheau J. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res*. 2003;140:1–47.

Rink E, Guo S. The too few mutant selectively affects subgroups of monoaminergic neurons in the zebrafish forebrain. *Neuroscience*. 2004;127:147-154.

Rosemberg DB, Braga MM, Rico EP, Loss CM, Córdova SD, Mussulini BH, Blaser RE, Leite CE, Campos MM, Dias RD, Calcagnotto ME, de Oliveira DL, Souza DO. Behavioral effects of taurine pretreatment in zebrafish acutely exposed to ethanol. *Neuropharmacology*. 2012;63:613-623.

Rosemberg DB, Rico EP, Mussulini BH, Piato AL, Calcagnotto ME, Bonan CD, Dias RD, Blaser RE, Souza DO, de Oliveira DL. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. *PLoS One*. 2011; 6(5):e19397.

Rosemberg DB, Rico EP, Langoni AS, Spinelli JT, Pereira TC, Dias RD, Souza DO, Bonan CD, Bogo MR. NTPDase family in zebrafish: Nucleotide hydrolysis, molecular identification and gene expression profiles in brain, liver and heart. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2010;155:230-240.

Savio LEB, Vuaden FC, Rosemberg DB, Bogo MR, Bonan CD, Wyse ATS. Long-term proline exposure alters nucleotide catabolism and ectonucleotidase gene expression in zebrafish brain. *Metab Brain Dis*. 2012;27:541-549.

Saxena S, Sahay A, Goel P. Effect of fluoride exposure on the intelligence of school children in Madhya Pradesh, India. *J Neurosci Rural Pract*. 2012;3(2):144–149.

Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp*. 2015; (96):e52434.

Senger MR, Rico EP, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Ecto-5'-nucleotidase activity in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2004;139:203-207.

Seraj B, Shahrabi M, Shadfar M, Ahmadi R, Fallahzadeh M, Eslamlu HF, Kharazifard MJ. Effect of high water fluoride concentration on the intellectual development of children in makoo/iran. *J Dent (Tehran)*. 2012 Summer;9(3):221-9

Sharma JD, Sohu D, Jain P. Prevalence of neurological manifestations in a human population exposed to fluoride in drinking water. *Fluoride*. 2009;42:127–132.

Sharma C, Suhalka P, Sukhwal P, Jaiswal N, Bhatnagar M. Curcumin attenuates neurotoxicity induced by fluoride: An in vivo evidence. *Pharmacogn Mag*. 2014; 10(37):61-5.

Singh R, Khatri P, Srivastava N, Jain S, Brahmachari V, Mukhopadhyay A, Mazumder S. Fluoride exposure abates pro-inflammatory response and induces in vivo apoptosis rendering zebrafish (*Danio rerio*) susceptible to bacterial infections. *Fish Shellfish Immunol*. 2017;63:314-321.

Song D, Jiang X, Liu Y, Sun Y, Cao S, Zhang Z. Asiaticoside Attenuates Cell Growth Inhibition and Apoptosis Induced by A $\beta$ (1-42) via Inhibiting the TLR4/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway in Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *Front Pharmacol*. 9:28, 2018.

Spittle B. Psychopharmacology of fluoride: a review. *Int Clin Psychopharmacol*. 1994;9:79-82.

Stern HM, Zon LI. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:533-539.

Strunecka A, Blaylock RL, Patocka J, Strunecky O. Immunoexcitotoxicity as the central mechanism of etiopathology and treatment of autism spectrum disorders: A possible role of fluoride and aluminum. *Surg Neurol Int*. 2018;9:74.

Sun Z, Zhang Y, Xue X, Niu R, Wang J. Maternal fluoride exposure during gestation and lactation decreased learning and memory ability, and glutamate receptor mRNA expressions of mouse pups. *Hum Exp Toxicol*. 2018; 37(1):87-93.

Trivedi MH, Sangai NP, Patel RS, Payak M, Vyas SJ. Assessment of groundwater quality with special reference to fluoride and its impact on iq of schoolchildren in six villages of the mundra region, kachchh, Gujarat, India. *Fluoride* 2012; 45(4):377-383.

Valdez-Jiménez L, Soria Fregozo C, Miranda Beltrán ML, Gutiérrez Coronado O, Pérez Vega MI. Effects of the fluoride on the central nervous system. *Neurologia*. 2011;26:297–300.

Vani ML, Reddy KP. Effects of fluoride accumulation on some enzymes of brain and gastrocnemius muscle of mice. *Fluoride*. 2000;33:17-26.

Vascotto SG, Beckham Y, Kelly GM. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochem Cell Biol*. 1997;75:479-485.

Vignet C, Le Menach K, Lyphout L, Guionnet T, Frère L, Leguay D, Budzinski H, Cousin X, Bégout ML. Chronic dietary exposure to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs causes physiological disruption in zebrafish--part II: behavior. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2014; 21(24):13818-32

Vuaden FC, Savio LE, Ramos DB, Casali EA, Bogo MR, Bonan CD. Endotoxin-induced effects on nucleotide catabolism in mouse kidney. *Eur J Pharmacol*. 2012;674:422-429.

Wang SX, Wang ZH, Cheng XT, Li J, Sang ZP, Zhang XD, Han LL, Qiao XY, Wu ZM, Wang ZQ. Arsenic and fluoride exposure in drinking water: children's IQ and growth in Shanyin county, Shanxi province, China. *Environ Health Perspect*. 2007;115(4):643-7.

Wang J, Zhang Y, Guo Z, Li R, Niu R. Effects of perinatal fluoride exposure on the expressions of miR-124 and miR-132 in hippocampus of mouse pups. *Chemosphere* 2018; 197, 117-122..

Wei N, Dong YT, Deng J, Wang Y, Qi XL, Yu WF, Xiao Y, Zhou JJ, Guan ZZ. Changed expressions of N-methyl-d-aspartate receptors in the brains of rats and

primary neurons exposed to high level of fluoride. *J Trace Elem Med Biol.* 2018;45:31-40.

Wong K, Elegante M, Bartels B, Elkhayat S, Tien D, Roy S, Goodspeed J, Suci C, Tan J, Grimes C, Chung A, Rosenberg M, Gaikwad S, Denmark A, Jackson A, Kadri F, Chung KM, Stewart A, Gilder T, Beeson E, Zapolsky I, Wu N, Cachat J, Kalueff AV. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res.* 2010;208:450-457.

World Health Organization (WHO). Guidelines for Drinking-water Quality (GDWQ). 2004;4:1-17.

Yan N, Liu Y, Liu S, Cao S, Wang F, Wang Z, Xi S. Fluoride-Induced Neuron Apoptosis and Expressions of Inflammatory Factors by Activating Microglia in Rat Brain. *Mol Neurobiol.* 2016; 53(7):4449-60.

Yang L, Ho NY, Alshut R, Legradi J, Weiss C, Reischl M, Mikut R, Liebel U, Müller F, Strähle U. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reprod Toxicol.* 2009;28:245-253.

Yuan J, Li Q, Niu R, Wang J. Fluoride exposure decreased learning ability and the expressions of the insulin receptor in male mouse hippocampus and olfactory bulb. *Chemosphere.* 2019; 224:71-76.

Zhang M, Wang A, Xia T, He P. Effects of fluoride on DNA damage, S-phase cell-cycle arrest and the expression of NF-kappaB in primary cultured rat hippocampal neurons. *Toxicol Lett.* 2008; 179(1):1-5.

Zhang Y, Zhang Y, Zheng X, Xu R, He H, Duan X. Grading and quantification of dental fluorosis in zebrafish larva. *Arch Oral Biol.* 2016;70:16-23.

Zhang S, Niu Q, Gao H, Ma R, Lei R, Zhang C, Xia T, Li P, Xu C, Wang C, Chen J, Dong L, Zhao Q, Wang A. Excessive apoptosis and defective autophagy contribute to developmental testicular toxicity induced by fluoride. *Environ Pollut.* 2016; 212:97-104.

Zhou G, Tang S, Yang L, Niu Q, Chen J, Xia T, Wang S, Wang M, Zhao Q, Liu L, Li P, Dong L, Yang K, Zhang S, Wang A. Effects of long-term fluoride exposure on cognitive ability and the underlying mechanisms: Role of autophagy and its association with apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2019;378:114608.

## ANEXO

## ANEXO A- PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



## CERTIFICADO

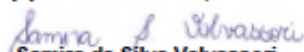
Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, 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 pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNESC, em reunião de 23/04/2019.

Título do projeto	Avaliação neuroquímica e comportamental do fluoreto de sódio em peixe-zebra
Project title	Neurochemical and behavioral assessment of sodium fluoride in zebrafish
Número do protocolo Protocol number	014/2019-1 VERSÃO 2
Pesquisador principal Principal Investigator	EDUARDO PACHECO RICO
Pesquisadores Researchers	Henrique Teza Bernardo, Niuany Viel Mendes, Alice Ferreira Inácio, Sulingue Casagrande Vicentim, Samira Leila Baldin, Ana Caroline Salvador de Farias.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/05/2019 a 04/12/2019
Espécie/linhagem/raça	Peixe/ <i>Danio rerio</i> – <i>short-fin</i>
Idade/Peso	4 meses/400 – 500mg
Gênero	Masculino e Feminino
Número de animais	245 Masculinos e 246 Femininos = 491
Origem	Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, CNPJ 92.969.856/0001-98 Localização: Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo. Bairro Santa Cecília. Porto Alegre – RS. CEP (Zip Code): 90035-000

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](mailto:ceua@unesc.net).

  
Samira da Silva Valvassori  
Coordenadora do CEUA

Criciúma, 23 de Abril de 2019