

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

DAIANA ALVES SPILERE

**EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA PÓS EXPOSIÇÃO REPETIDA AO
ETANOL NA MEMÓRIA E NA NEUROTRANSMISSÃO DO PEIXE-
ZEBRA**

CRICIÚMA, FEVEREIRO DE 2024

DAIANA ALVES SPILERE

**EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA PÓS EXPOSIÇÃO REPETIDA AO
ETANOL NA MEMÓRIA E NA NEUROTRANSMISSÃO DO 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, FEVEREIRO DE 2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S756e Spilere, Daiana Alves.

Efeitos da n-acetilcisteína pós exposição repetida ao etanol na memória e na neurotransmissão do peixe-zebra / Daiana Alves Spilere. - 2024.
49 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2024.

Orientação: Eduardo Pacheco Rico.

1. Alcoolismo. 2. Álcool - Efeito fisiológico. 3. N-acetilcisteína. 4. Alcoolismo - Tratamento. 5. Colinérgicos. 6. Ácido glutâmico. 7. Memória. I. Título.

CDD 23. ed. 616.861

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

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo ABNT e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório Psiquiatria Translacional do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
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 445

Com início às 14 (quatorze) horas do dia 28 (vinte e oito) de fevereiro de 2024 (dois mil e vinte e quatro), realizou-se, na Sala 208/Bloco R1, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **DAIANA ALVES SPILERE**, sob a orientação do **Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico**, intitulada **“EFEITOS DA N-ACETILCISTEÍNA PÓS EXPOSIÇÃO REPETIDA AO ETANOL NA MEMÓRIA E NA NEUROTRANSMISSÃO DO PEIXE-ZEBRA”**. A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Emilio Luiz Streck (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Profa. Dra. Samira da Silva Valvassori (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, e Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena (Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE) – 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 16h (dezesseis) horas, dos quais eu, Samiris Albano Pereira, Secretária 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, 28 (vinte e oito) de fevereiro de 2024 (dois mil e vinte e quatro).

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

Samiris Albano Pereira
Secretária

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade do Extremo Sul Catarinense, que contribuiu para a minha formação acadêmica desde a minha graduação. Agradeço a todos os professores, amigos e colegas que me inspiraram e acompanharam na minha jornada nesta universidade.

A todos os professores, colaboradores, alunos de doutorado, mestrado e iniciação científica do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde por todo o acolhimento, auxílio e conhecimento que me proporcionaram ao longo da minha formação.

Ao Grupo de Pesquisa em Alcoolismo, por toda a ajuda, companheirismo e amizade, esse trabalho é também de vocês.

Ao meu orientador, professor Eduardo Pacheco Rico, que esteve sempre presente para me guiar nesse caminho. Meu agradecimento e admiração por toda a dedicação, paciência e disponibilidade que emprega a mim e todos os seus alunos.

Aos amigos que o mestrado me trouxe, Jorge, Taise e Ana, vocês fizeram essa jornada mais leve e divertida, e eu aprendi muito com vocês.

A CAPES e a FAPESC pelo apoio financeiro, tornando este trabalho possível de ser realizado.

Aos meus pais, que sempre incentivaram meus estudos e acreditaram em mim.

Por fim ao meu companheiro de vida, Guilherme, por ser meu porto seguro, meu incentivo e meu alívio. O meu caminho até aqui não seria o mesmo sem você!

Ao destino, feito por mim e pelo acaso.

RESUMO

O álcool é a droga lícita mais consumida no mundo. Em 2016 gerou um impacto negativo na qualidade de vida de aproximadamente 133 milhões de pessoas. O uso de álcool gera riscos para o desenvolvimento de transtorno por uso de álcool (TUA). O seu metabolismo é iniciado pela conversão do etanol a acetaldeído, pela enzima álcool desidrogenase (ADH), e então do acetaldeído a acetato, pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH). No cérebro, esses metabólitos alteram o funcionamento de diversos sistemas de neurotransmissão, como o glutamatérgico e o colinérgico, além de prejudicar a memória e aprendizagem. Os medicamentos para tratamento do TUA causam efeitos adversos e contraindicações. A N-acetilcisteína (NAC) um fármaco antioxidante, com evidências de proteger a memória e reestabelecer os níveis de acetilcolinesterase (AChE), além de ser um antioxidante que atua juntamente a glutathiona, que está relacionada a sinapse do glutamato. O peixe-zebra é um modelo animal consolidado para estudos com álcool e fármacos, já tem seus sistemas neurotransmissores caracterizados e em estudos com etanol e NAC, ela foi capaz de reverter os danos do álcool na ansiedade e no estresse oxidativo. Neste contexto, o propósito do presente estudo foi investigar os efeitos da exposição repetida ao etanol (ERE) na sinalização colinérgica e glutamatérgica, como também na memória do peixe-zebra. Os animais foram expostos ao etanol 1% por 8 dias durante 20 minutos. Receberam tratamento com NAC após a oitava exposição ao etanol por 10 ou 60 minutos. A eutanásia ocorreu um dia após a oitava exposição. Foram realizados os comportamentos de esquivas inibitória e reconhecimento de objeto, e as dosagens das atividades das enzimas colina acetiltransferase (ChAT) e AChE, e captação de glutamato. Os resultados mostram um aumento significativo da AChE no grupo exposto ao etanol e uma diminuição nos expostos, porém tratados com NAC por 10 minutos. Nenhuma diferença foi observada na ChAT. A captação de glutamato foi significativamente menor no grupo exposto ao etanol, mas o grupo tratado com NAC após a exposição não apresentou diferenças em relação ao controle. Na esquivas inibitória todos os grupos demonstraram aquisição da memória aversiva exceto o grupo exposto ao etanol. No reconhecimento de objeto o único grupo que apresentou maior tempo de exploração ao objeto novo foi o grupo tratado com NAC. O presente estudo demonstrou que a ERE alterou a AChE, a captação de glutamato e a memória aversiva da esquivas inibitória, e que esses danos foram atenuados pela NAC. Esses efeitos ocorreram após um único tratamento com NAC, sugerindo que outros protocolos de tratamento podem apresentar resultados mais significativos. Estes resultados contribuem para um melhor entendimento dos mecanismos da ERE, bem como das propriedades da NAC frente aos danos causados pelo etanol no peixe-zebra.

Palavras-chave: alcoolismo, colinérgico, glutamato, memória, NAC, peixe-zebra

ABSTRACT

Alcohol is the most consumed legal drug in the world. In 2016, it had a negative impact on the quality of life of approximately 133 million people. Alcohol use increases risks for developing alcohol use disorder (AUD). Its metabolism is initiated by the conversion of ethanol to acetaldehyde, by the enzyme alcohol dehydrogenase (ADH), and then from acetaldehyde to acetate, by the enzyme aldehyde dehydrogenase (ALDH). In the brain, these metabolites alter the functioning of several neurotransmission systems, such as glutamatergic and cholinergic, and impaired memory and learning. Medications for treating AUD cause side effects and have contraindications. N-acetylcysteine (NAC) is an antioxidant drug, with evidence of protecting memory and restoring acetylcholinesterase (AChE) levels, in addition it is an antioxidant that works together with glutathione, which is related to the glutamate synapse. Zebrafish is a consolidated animal model for studies with alcohol and drugs, its neurotransmitter systems have already been characterized and in studies with ethanol and NAC, it was able to reverse the damage caused by alcohol in anxiety and oxidative stress. In this context, the purpose of the present study was to investigate the effects of repeated exposure to ethanol (ERE) on cholinergic and glutamatergic signaling, as well as on memory in zebrafish. The animals were exposed to 1% ethanol for 8 days for 20 minutes. They received treatment with NAC after the eighth exposure to ethanol for 10 or 60 minutes. Euthanasia occurred one day after the eighth exposure. Inhibitory avoidance and object recognition behaviors were performed, as well as biochemistry of the activities of the enzymes choline acetyltransferase (ChAT), AChE, and glutamate uptake. The results show a significant increase in AChE in the group exposed to ethanol and a decrease in those exposed but treated with NAC for 10 minutes. No difference was observed in ChAT. Glutamate uptake was significantly lower in the group exposed to ethanol, but in the group treated with NAC after exposure there were no differences in comparison to control group. In inhibitory avoidance, all groups demonstrated acquisition of aversive memory except the group exposed to ethanol. In object recognition, the only group that showed longer exploration time in the new object was the group treated with NAC. The present study demonstrated that ERE altered AChE, glutamate uptake and aversive memory of inhibitory avoidance, and that these damages were attenuated by NAC. These effects occurred after a single treatment with NAC, suggesting that other treatment protocols may provide more significant results. These results contribute to a better understanding of the mechanisms of ERE, as well as the properties of NAC in the face of damage caused by ethanol in zebrafish.

Keywords: alcoholism, cholinergic, glutamate, memory, NAC, zebrafish

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Desenho experimental do protocolo de exposição repetida ao etanol (ERE).....	19
Figura 2: Linha do tempo da esquiva inibitória.....	24
Figura 3: Linha do tempo do teste de reconhecimento de objeto.....	25
Figura 4: Efeito da ERE nos grupos controle e etanol não tratados e tratados com NAC por 10 minutos ou 60 minutos sobre a atividade da ChAT em encéfalos de peixe-zebra	26
Figura 5: Efeito da ERE nos grupos controle e etanol não tratados e tratados com NAC por 10 minutos ou 60 minutos sobre a atividade da AChE em encéfalos de peixe-zebra.....	27
Figura 6: Efeito da ERE e tratamento com NAC sobre a captação de glutamato em encéfalos de peixe-zebra.....	28
Figura 7: Efeito da ERE sobre a memória aversiva da esquiva inibitória no peixe-zebra.....	29
Figura 8: Efeito da ERE sobre a memória de aprendizado no teste de reconhecimento de objeto no peixe-zebra.....	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
1.1 EPIDEMIOLOGIA DO ÁLCOOL.....	8
1.2 METABOLISMO DO ÁLCOOL E EFEITOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL.....	9
1.3 TRATAMENTOS PARA O USO DE ÁLCOOL.....	11
1.4 MEMÓRIA E O IMPACTO DO USO DE ÁLCOOL.....	12
1.5 N-ACETILCISTEÍNA.....	13
1.6 PEIXE-ZEBRA.....	14
1.7 JUSTIFICATIVA.....	16
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 ANIMAIS.....	18
3.2 EXPOSIÇÃO REPETIDA AO ETANOL E TRATAMENTO COM N-ACETILCISTEÍNA.....	18
3.3 DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	19
3.4 AVALIAÇÕES NEUROQUÍMICAS DO SISTEMA COLINÉRGICO.....	20
3.4.1 Determinação da atividade da colina acetiltransferase (ChAT).....	20
3.4.2 Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE).....	21
3.5 AVALIAÇÕES NEUROQUÍMICAS SISTEMA GLUTAMATÉRGICO.....	22
3.5.1 Ensaio do transporte de glutamato.....	22
3.5.1.1 Preparação do tecido.....	22
3.5.1.2 Ensaio de captação de glutamato.....	22
3.6 ESQUIVA INIBITÓRIA.....	23
3.7 RECONHECIMENTO DE OBJETO.....	24
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	25
4 RESULTADOS.....	26
4.1 SISTEMA COLINÉRGICO.....	26
4.2 CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO.....	27
4.3 ESQUIVA INIBITÓRIA.....	28
4.4 RECONHECIMENTO DE OBJETO.....	30
5 DISCUSSÃO.....	31
6 CONCLUSÃO.....	38
7 REFERÊNCIAS.....	39
ANEXO.....	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO ÁLCOOL

O álcool é a droga lícita mais consumida no mundo. Na região das Américas, Europa e Pacífico Ocidental, o percentual da população que faz uso dessa substância de forma recorrente ultrapassa os 50%. Especificamente nas Américas, a quantidade consumida pela população total é de 17,4 g/dia *per capita*. Já entre os consumidores recorrentes, o consumo chega a atingir cerca de 32,8 g/dia. Embora existam diversos fatores sociais e ambientais que levem a diferenças entre os continentes, vem sendo observado um aumento geral na quantidade de álcool ingerida entre os consumidores recorrentes: no ano de 2000 a média de consumo era de 11,1 litros e, em 2016, atingiu 15,1 litros de álcool puro *per capita* (WHO, 2018).

Existem diferentes padrões de consumo de álcool que levam ao risco para o desenvolvimento de transtorno por uso de álcool (TUA). Um deles é uso em *binge*, definido pelo Instituto Nacional de Abuso de Álcool e Alcoolismo dos Estados Unidos (2023) como a dose necessária para atingir a concentração de 0,08 g/dL de álcool no sangue em um período de duas horas. Ocorre também o uso pesado de álcool, que pode ser crônico, definido pelo Ministério da Saúde do Brasil (2023) como a ingestão de mais de 4 drinks por dia ou mais de 14 por semana, para homens, e mais do que 3 por dia ou mais do que 7 por semana, para mulheres e idosos. No Brasil, em 2016, 48,1% dos consumidores recorrentes vivenciaram pelo menos um episódio de uso pesado de álcool (WHO, 2020).

Segundo o Manual Diagnóstico Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5), o TUA é uma doença crônica e multifatorial, que causa comprometimento ou sofrimento clinicamente significativos, ele ainda pode ser subclassificado como leve, moderado ou grave, dependendo da quantidade de critérios manifestados, que abrangem desde a quantidade e frequência de uso, até o desejo de consumir e o quanto ele interfere nas atividades do dia a dia do indivíduo.

O uso nocivo de álcool provoca diversas consequências para a saúde: em 2016, aproximadamente 3 milhões de mortes no mundo ocorreram devido ao uso da

substância, representando 5,3% das mortes totais daquele ano. A maioria das mortes atribuídas ao uso nocivo de álcool foram devido a doenças digestivas (21,3%), lesões não intencionais (20,9%), doenças cardiovasculares e diabetes (19%). Além de mortes, em 2016 o álcool comprometeu anos de vida em saúde plena e diminuiu a expectativa de vida de cerca de 133 milhões de pessoas devido à violência doméstica, acidentes de trânsito, relações sexuais sem proteção e inúmeras doenças, tais como cânceres, diabetes, epilepsia, doenças cardiovasculares e digestivas. Devido a isso, ocorre a promoção de diversas políticas em saúde pública para combater o uso nocivo de álcool na população (WHO, 2018).

1.2 METABOLISMO DO ÁLCOOL E EFEITOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A absorção do álcool pelo organismo se dá rapidamente após a ingestão, devido à alta solubilidade à água presente no sangue, e a constante de Michaelis-Menten (K_m) da enzima álcool desidrogenase (ADH) ser baixa, o que leva a reação a saturar rapidamente (Norberg et al., 2003). O metabolismo ocorre primariamente no fígado, iniciado pela conversão do etanol a acetaldeído, pela enzima ADH, e então do acetaldeído a acetato, pela enzima aldeído desidrogenase (Palmer et al., 2019). Os metabólitos do álcool são altamente tóxicos e influenciam na respiração celular, então, ao serem transportados por todo o corpo, atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) e chegam ao sistema nervoso central (SNC), onde interagem com membranas celulares e canais iônicos, neurônios e seus receptores, gerando efeitos dose-dependentes (Abrahão et al., 2017; Wei et al., 2021).

O glutamato, como o principal neurotransmissor excitatório do SNC, tem seus neurônios distribuídos por todo o encéfalo e é indispensável para vários processos, principalmente os envolvidos na neuroplasticidade, aprendizagem e memória (Bell et al., 2016). Em situações fisiológicas, o glutamato liberado na fenda sináptica tem sua recaptação realizada por células gliais próximas, no qual é convertido a glutamina (Bak et al., 2006). Esta, conseqüentemente, é transportada ao neurônio pré-sináptico, onde é convertida novamente a glutamato, que fica armazenado nas vesículas pré-sinápticas, reiniciando o ciclo (Bell et al., 2016). A glutamina também pode ser desviada para o ciclo

de síntese de GABA, ou ainda, o glutamato pode ser desidrogenado a α -cetoglutarato, um componente do ciclo de Krebs (Petroff, 2002; Tapiero et al. 2002).

Ademais, na exposição aguda ao álcool, ocorre a inibição de todos os receptores do glutamato em diversas regiões do cérebro, e por consequência, causa diminuição da função cognitiva e atenção, pois altera os mecanismos de sono-vigília, além de ser capaz de causar o fenômeno do *blackout* (Costardi et al., 2014; Bell et al., 2016). Estudos demonstraram que o uso de álcool ativa a via de sinalização da proteína alvo da rapamicina (mTOR), que altera a permeabilidade dos receptores de glutamato, contribuindo para o aumento do uso e recompensa de álcool (Laguesse et al., 2017). Já quando administrado de forma crônica, o efeito exercido é o aumento extracelular de glutamato, ativando de forma secundária diversas vias neurais, a depender da área cerebral. No sistema mesocorticolímbico o aumento de glutamato reforça os mecanismos de abstinência, e já demonstrou estar associado ao aumento de consumo de álcool em animais (Christian et al., 2013; Griffin et al., 2014; Bell et al., 2016).

Outro neurotransmissor envolvido na fisiopatologia do consumo de álcool é a acetilcolina (ACh). Os neurônios colinérgicos são, assim como os do glutamato, distribuídos por todo o cérebro, inclusive no hipocampo, sendo relacionados a memória, aprendizagem, sono e atenção (Armstrong et al., 1968; Picciotto et al., 2012; Ferreira-Vieira et al., 2016; Haam e Yakel, 2017). Quando liberada na fenda sináptica, a ACh é hidrolisada pela acetilcolinesterase (AChE) em colina e acetato, então a colina é transportada de volta ao terminal pré-sináptico, onde a colina acetiltransferase (ChAT) adiciona um acetil-CoA a colina, transformando-a novamente em acetilcolina (Zimmermann, 2008).

Estudos demonstraram que, no sistema mesocorticolímbico, o etanol modula a ação da ACh ao aumentar a despolarização pré-sináptica, levando a altos níveis extracelulares de ACh, que interagem com seus receptores nos neurônios dopaminérgicos, causando uma maior liberação de dopamina na fenda (Hendrickson et al., 2013; Schilaty et al., 2013; Loftén et al., 2020). Este fenômeno é fortemente relacionado ao mecanismo de recompensa e reforço do álcool, sendo considerado um potencial alvo farmacológico para tratamento de TUA. (Rahman e Prendergast, 2012; Walker et al., 2020).

Embora muito dos efeitos diretos e indiretos relacionados aos sistemas de neurotransmissão promovidos pela toxicidade do consumo abusivo de álcool já tenham sido descritos, inúmeros fatores podem estar relacionados a outros mecanismos biológicos. Trata-se de fatores genéticos, que contribuem para o desenvolvimento de TUA, a regulações epigenéticas, alterações em fatores de transcrição e proteínas. Por consequência, ocorre uma ampla neuromodulação no funcionamento dos neurônios e seus receptores, transportadores e demais participantes do funcionamento das sinapses cérebro (Shabani e Gharehziaaddin 2020; Egervari et al., 2021).

1.3 TRATAMENTOS PARA O USO DE ÁLCOOL

Os medicamentos atualmente utilizados para o tratamento por uso de álcool, variam em tipo e dose, a depender se os sintomas requerem um atendimento emergencial ou não, se são um tratamento de TUA, ou uma síndrome de abstinência alcoólica. No caso de tratamento para TUA, os medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) são: Disulfiram, Acamprosato e Naltrexona. No continente europeu e outros países também são aprovados o uso de Nalmefene e Baclofen. Outros diversos medicamentos são utilizados de forma *off label* e incluem anticonvulsivantes e remédios para enjoo, como topiramato, ondansetrona, gabapentina e vareniclina, entre outros (Witkiewitz et al., 2019).

O Disulfiram foi o primeiro medicamento aprovado para tratamento do TUA, sendo um inibidor irreversível da enzima aldeído desidrogenase, provocando o acúmulo de acetaldeído, que por ser uma substância tóxica, gera efeitos como taquicardia, dor de cabeça, náusea e vômitos (Witkiewitz et al., 2019). Desta forma, esses sintomas desagradáveis são psicologicamente associados ao álcool pelo paciente, o que desincentiva o uso dele. Portanto, para que esta medicação seja a escolhida para o tratamento e tenha seu objetivo alcançado, o paciente deve estar comprometido em entrar em abstinência e entender os riscos que ele pode trazer se usado concomitantemente ao álcool, visto que o Disulfiram aumenta o risco de hepatite aguda e não deve ser utilizado por pacientes com doenças cardíacas (Skinner et al., 2014; Reus et al., 2018; Cohen et al., 2022).

O Acamprosato ajuda iniciar e manter a abstinência em pacientes com TUA moderada ou severa, auxilia também na redução do consumo de álcool (Reus et al., 2018). Seu mecanismo de ação não é totalmente compreendido, mas sabe-se que é um neuromodulador nas situações de hiperativação glutamatérgica (Rösner et al., 2010). O efeito colateral mais comum é a diarreia, mas pode ocorrer náusea, vômito, dor de cabeça e tontura (Witikiewitz et al., 2019). Como sua excreção é renal, não é indicado como tratamento para indivíduos com comprometimento deste órgão (Reus et al., 2018; Cohen et al., 2022).

A Naltrexona é um antagonista de receptor opioide utilizada para tratamento de alcoolismo, ela é mais eficaz em reduzir as chances de recaída e auxiliar na redução do consumo para que o paciente possa entrar na abstinência (Reus et al., 2018). Seus efeitos colaterais incluem náusea, dor de cabeça, tontura e problemas de sono (Witikiewitz et al., 2019). Por ser um antagonista opioide, não deve ser utilizado por pacientes que tenham transtorno por uso de opioides. Outro fator que descarta seu uso são pacientes com hepatite ou falência hepática, pois este medicamento tem risco de hepatotoxicidade. (Reus et al., 2018; Cohen et al., 2022).

Para tratamento da síndrome de abstinência alcoólica, os medicamentos de primeira linha são os benzodiazepínicos, que são usados para cessar os sintomas graves de convulsões e *delirium tremens* (Attilia et al., 2018; Cohen et al., 2022). Como esses medicamentos são muito passíveis de abuso e overdose, normalmente só são administrados em ambiente hospitalar (Votaw et al., 2019). Seu uso deve ser feito com atenção em caso de alterações hepáticas prévias (Cohen et al., 2022).

Diversos outros medicamentos e suplementos são estudados atualmente, em busca de encontrar melhores esquemas de tratamentos, junto aos já aprovados para o uso, e também alternativos, a fim de evitar efeitos adversos, melhorar os sintomas e promover uma maior adesão ao tratamento pelos pacientes (Attilia et al., 2018; Witikiewitz et al., 2019).

1.4 MEMÓRIA E O IMPACTO DO USO DE ÁLCOOL

As memórias são formadas a partir da aquisição de experiências, que aumentam

as sinapses glutamatérgicas, e esse aumento promove uma transição de memória de curto para longo prazo, devido a transcrição de novos genes, novas proteínas e fatores de crescimento, que reforçam essas sinapses (Asok et al., 2020). O hipocampo é a principal área do cérebro responsável pela retenção de memória recente e memórias de reconhecimento fortes, tanto de objetos como de situações, sendo crucial na neurogênese na fase adulta, além de aprendizagem, comportamento e cognição (Opitz, 2014; Toda e Cage, 2017). No entanto, diversos danos fisiológicos ou ambientais, como o uso de álcool, podem impactar nessa área (McClain et al., 2014). Estudos em humanos e em animais obtiveram resultados de declínio de performance de atividades cognitivas em indivíduos que fizeram uso de álcool (Elliot et al., 2021; Amorim et al., 2017), inclusive impactando na aquisição e consolidação da memória em ratos (Zhu et al., 2020). O álcool também pode causar alterações cerebrais e prejudicar o neurodesenvolvimento de adolescentes (Less et al., 2020) e aumentar o risco de sequelas e demência em idosos (Topiwala e Ebmeier, 2018).

Estudos já correlacionaram o uso agudo de álcool a disfunção da atividade celular do hipocampo, por diversos mecanismos, que geram efeitos na memória e aprendizado (White et al., 2000). Ademais, o uso pesado de álcool altera as funções cerebrais e diminui a capacidade cognitiva (Gutwinski et al., 2018). Achados encontraram uma conexão entre o TUA e a resposta neuroimune, estresse e excitotoxicidade hiperglutamatérgica, pela intervenção em vias de sinalização celular como a mTOR, quinase dependente de ciclina 5 (CDK5), glicogênio sintase quinase-3 β (GSK3 β) e hiperfosforilação direta da proteína TAU, gerando neurodegeneração e Alzheimer (Kamal et al., 2020).

1.5 N-ACETILCISTEÍNA

A N-Acetilcisteína (NAC) é um fármaco já conhecido e aprovado para uso em humanos desde 1963 pela FDA e 1999 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). A Anvisa autoriza seu uso nas formas de solução nasal, xarope, granulado e solução injetável, na indicação de dificuldade para expectorar, quando há muita secreção densa e viscosa, tais como: bronquite crônica e suas exacerbações, enfisema, doença

pulmonar obstrutiva crônica, bronquite aguda, pneumonia, colapso pulmonar/atelectasia, fibrose cística/mucoviscidose. Também é indicado como antídoto na intoxicação acidental ou voluntária por paracetamol.

A NAC é um derivado de cisteína com um grupo acetil ligado ao seu nitrogênio. Ela penetra a BHE e funciona como um provedor do aminoácido cisteína no sistema da glutathione redutase (GSH), atuando como um antioxidante neste e em outros sistemas protetores, interagindo com diversas rotas metabólicas que regulam até mesmo o ciclo celular e apoptose (Samuni et al., 2013).

Este medicamento tem sido alvo de diversos estudos que buscam compreender seu funcionamento em uma ampla gama de doenças, tais como transtornos de vícios de diversas substâncias, doenças neurodegenerativas e doenças psiquiátricas, visto que suas ações no cérebro podem até mesmo modular sistemas de neurotransmissão, tais como o do glutamato, importante neurotransmissor na maioria dos distúrbios (Bavarsad Shahripour et al, 2014; McClure et al., 2014; Slattery et al., 2015; Smaga et al., 2021).

Diversos estudos, incluindo revisões sistemáticas e meta-análises, em animais e humanos, encontraram evidências de que a NAC é capaz de reduzir o desejo e busca por drogas de abuso, como a cocaína, heroína, nicotina e álcool, devido a reestruturação do funcionamento das sinapses glutamatérgicas, pela ação nos transportadores de glutamato e no sistema co-transportador de cistina e glutamato (Brown et al., 2013; McClure et al., 2014; Duailibi et al., 2017; Back et al., 2020; Quintanilla et al., 2020; Smaga et al., 2021). A NAC também auxilia na cognição, pois, estudos em animais demonstraram que ela previne déficits e protege a memória após diferentes insultos que impactam nas sinapses colinérgicas, reestabelecendo os níveis de AChE (Gonçalves et al., 2010; Costa et al., 2016).

1.6 PEIXE-ZEBRA

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um teleósteo de água doce da família *Cyprinidae*. Ele tem sido utilizado como modelo experimental em diversas áreas como: genética e genômica, teratologia, biologia do desenvolvimento, comportamento e toxicologia (Vascotto et al., 1997; Sheets et al., 2021; Horzmann e Freeman, 2018). O peixe-zebra é

igualmente consolidado para estudos de drogas e medicamentos diversos, visto que a administração de muitas substâncias pode ser feita pela diluição em água, que é capaz de atingir o SNC do animal e gerar efeitos variados (Goldsmith, 2004; Blank et al., 2009; Froehlicher et al., 2009; Yang et al., 2009; MacRae e Peterson, 2015).

Sabe-se que o peixe tem um SNC desenvolvido, com diversos sistemas de neurotransmissão identificados e descritos, 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; Senger et al., 2004; Vuaden et al., 2014).

Em estudos com álcool, o peixe-zebra é um modelo animal largamente utilizado a mais de 20 anos, com protocolos comportamentais e doses de administração crônica e aguda estabelecidas (Gerlai et al., 2000; Gerlai et al., 2006). Estudos demonstraram que a administração crônica e a retirada do álcool são capazes de impactar no aprendizado de experiência aversiva da esQUIVA inibitória (Amorim et al., 2017). Diferentes condições de exposição alteram parâmetros glutamatérgicos, dopaminérgicos e colinérgicos (Agostini et al., 2018; Bernardo et al., 2019; Alexandre et al., 2019; Vizuette et al., 2022). Um recente protocolo de administração, a exposição repetida ao etanol (ERE) trouxe alterações comportamentais e de estresse oxidativo no peixe (Müller et al., 2017).

O peixe-zebra, além de ser um modelo animal que auxilia na compreensão da fisiopatologia do álcool, também é utilizado para compreender mecanismos de ação farmacológicos (Kalueff et al., 2014; MacRae e Peterson, 2015; Müller et al., 2020). A NAC tem protocolos estabelecidos e resultados promissores no peixe-zebra, que demonstra apresentar propriedades protetoras contra estresse agudo e ansiedade (Mocelin et al., 2015). Além disso, peixes submetidos a repetidas exposições agudas de etanol, e tratados com NAC, apresentaram redução no comportamento tipo ansioso e em parâmetros relacionados ao dano oxidativo (Mocelin et al., 2018; Mocelin et al. 2019). No entanto, ainda não se sabe os efeitos da NAC no peixe-zebra, em sistemas de neurotransmissores e tarefas cognitivas associados ao uso de álcool.

1.6 JUSTIFICATIVA

Considerando a importância do uso de álcool na sociedade e seus efeitos negativos para o organismo, principalmente no cérebro e na cognição, como também as limitações existentes nos tratamentos, são necessárias mais pesquisas para sanar estas lacunas. O peixe-zebra é um organismo consolidado para diversos estudos relacionados a neurociências, como modelos de exposição a drogas de abuso e varredura de fármacos para seu tratamento, além disso, as evidências prévias têm apresentado a NAC como uma molécula promissora em protocolos consolidados de exposição ao álcool. Dito isto, o presente projeto busca investigar neste modelo animal os efeitos neuroquímicos do álcool no sistema colinérgico e glutamatérgico, e comportamentais relacionados a memória, como também compreender ação da NAC por si só e seus efeitos frente a exposição ao álcool. Os achados deste estudo poderão contribuir para a compreensão dos eventos biológicos do uso de álcool e de substâncias farmacológicas sob uma nova perspectiva.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos comportamentais e neuroquímicos da N-acetilcisteína (NAC) em peixes-zebra submetidos a exposição repetida ao etanol (ERE).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar parâmetros colinérgicos: atividade das enzimas da neurotransmissão colinérgica (ChAT e AChE) em encéfalos de peixes-zebra adultos submetidos a ERE e tratados com NAC.
- Aferir a atividade dos transportadores de glutamato por meio da captação de glutamato em encéfalos de peixes-zebra adultos submetidos a ERE e tratados com NAC.
- Comparar se os peixes-zebra adultos submetidos a ERE e tratados com NAC apresentam alterações na capacidade de consolidação de memória aversiva da esquiva inibitória.
- Elucidar se os peixes-zebra adultos submetidos a ERE e tratados com NAC apresentam alterações na capacidade de memória de reconhecimento de objeto.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Este estudo foi submetido à avaliação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e aprovado sob protocolo número 39/2022 (ANEXO).

Os peixes-zebras (*Danio rerio*) foram obtidos do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O ambiente de moradia consistiu em uma sala climatizada e exclusiva para os peixes, onde permaneceram alocados nos aquários a uma temperatura constante de $28,5 \pm 1^\circ\text{C}$, em água de osmose reversa aerada e salinizada, num ciclo de 14 horas no período claro e 10 horas no período escuro, controlado de forma programada e automática, numa proporção de machos/fêmeas 50:50. As condições de moradia seguiram o padrão de 3 peixes por litro de água e a alimentação foi realizada duas vezes ao dia com ração flocada Alcon® e *Artêmia salina*, alternadamente.

No presente estudo foram utilizados 216 animais, distribuídos em 6 grupos: 1 - Controle (C); 2 - Controle + NAC 10 minutos (N1); 3 - Controle + NAC 60 minutos (N6); 4 - Etanol (E); 5 - Etanol + NAC 10 minutos (EN1); 6 - Etanol + NAC 60 minutos (EN6). Os grupos com a letra “E” foram expostos ao etanol, os grupos com a letra “N” foram tratados com NAC. Os números 1 e 6 representam os tempos de tratamento com NAC por 10 ou 60 minutos, respectivamente. O método de eutanásia seguiu o protocolo de imersão em triclaína 160 mg/L por 30 segundos seguido de decapitação com bisturi para a retirada dos encéfalos.

3.2 EXPOSIÇÃO REPETIDA AO ETANOL E TRATAMENTO COM N-ACETILCISTEÍNA

Os reagentes utilizados, etanol (CAS · 64-17-5) – DCB – 00475) e a NAC (N-acetilcisteína DCB - 616-91-1) foram obtidos da *Sigma Aldrich*. A exposição ao álcool seguiu o protocolo ERE, validado para o peixe-zebra por Mathur e Guo (2011), que consistiu em transferir os peixes de seu aquário moradia para um outro aquário contendo

1% de álcool diluído na água, onde permaneceram por 20 minutos. Passado o tempo, foram transferidos novamente ao seu aquário moradia, esse procedimento foi realizado durante 8 dias consecutivos nos grupos E, EN1 e EN6. A fim de equiparar possíveis estresses de manipulação, os animais dos grupos C, N1 e N6 foram transferidos, na mesma frequência e durante o mesmo período, para um outro aquário, com somente a água salinizada habitual.

O tratamento com NAC ocorreu no último dia da ERE, logo após a última exposição, quando os peixes dos grupos N1, N6, EN1 e EN6 foram movidos para 4 aquários com concentração já estabelecida para o peixe-zebra de 1 mg de NAC por litro de água durante 10 minutos (grupos N1 e EN1) e 60 minutos (grupos N6 e EN6) (Mocelin et al., 2015). Após, os 6 grupos foram mantidos em aquários distintos e a eutanásia ocorreu no dia seguinte. O delineamento experimental das exposições, tratamentos e comportamentos podem ser observadas na figura 1 a seguir.

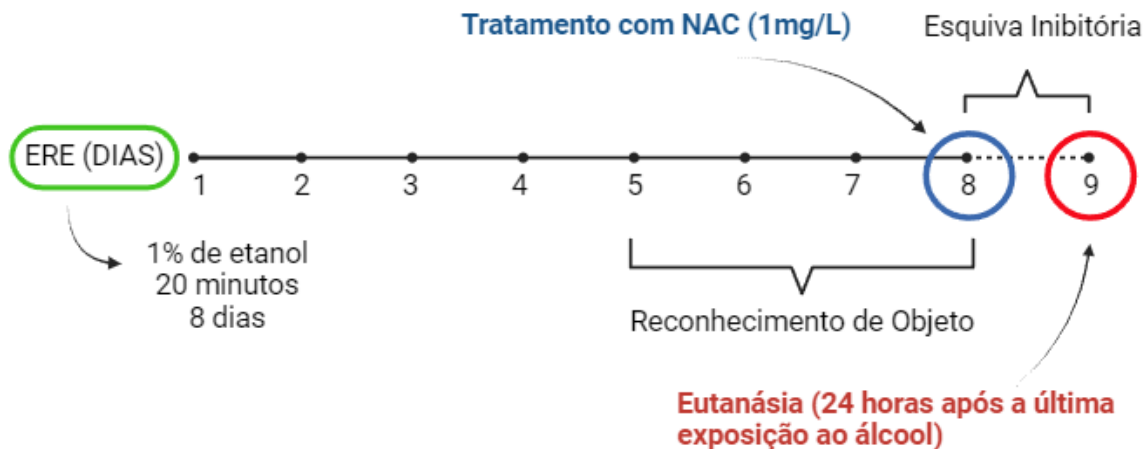


Figura 1: Desenho experimental do protocolo de exposição repetida ao etanol (ERE). Durante 8 dias consecutivos os animais dos grupos E, EN1 e EN6 foram expostos a 1% de etanol por 20 minutos. No oitavo dia os grupos N1, N6, EN1 e EN6 foram tratados com NAC. No dia seguinte ao tratamento os peixes foram eutanasiados. O experimento comportamental de esquiva inibitória ocorreu nos dias 8 e 9 do protocolo ERE. A tarefa comportamental de reconhecimento de objeto ocorreu entre os dias 5 e 8 da ERE.

3.3 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

O método de dosagem de proteínas utilizado foi adaptado de Lowry e colaboradores (1951). Inicialmente, realizou-se a curva de calibração em 6 microtubos, em duplicata, onde cada um continha uma quantidade decrescente (200-120 μ L) de água

milli-Q, e uma quantidade crescente (0-80 μL) de solução padrão de albumina, junto a 1000 μL Reativo C por microtubo. O Reativo C foi preparado no dia da dosagem, contendo uma parte de Reativo B1 e uma parte de reativo B2 para cem partes do Reativo A.

As amostras foram previamente homogeneizadas com tampões específicos a depender da técnica bioquímica posterior a ser feita. Para a dosagem foi utilizado o sedimento, em duplicados, onde juntamente adicionou-se 190 μL de água milli-Q, 10 μL do homogeneizado e 1000 μL de Reativo C, nesta ordem.

Posterior aos procedimentos descritos, cada microtubo foi agitado em um vórtex, então adicionado 100 μL de reagente Folin na concentração 1N em todos os tubos e foram agitados novamente. Após aguardar 20 minutos com as amostras no escuro transferiu-se a curva de calibração e as amostras dos microtubos para uma microplaca de 96 poços, na quantidade de 280 μL por poço. A leitura foi feita no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 650 nm no modo *endpoint*.

3.4 AVALIAÇÕES NEUROQUÍMICAS DO SISTEMA COLINÉRGICO

3.4.1 Determinação da atividade da colina acetiltransferase (ChAT)

A atividade da ChAT foi realizada de acordo com o método adaptado de Chao e Wolfgram (1973). Foram utilizados um *pool* de 2 encéfalos por amostra, sendo 6 amostras por grupo, totalizando 72 animais. Os encéfalos foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio 0,5 M e seu sedimento foi utilizado para a dosagem de proteínas pelo método descrito no item 3.5.

Em uma microplaca UV foi pipetado cerca de 190-195 μL de água milli-Q calculada para cada amostra conforme a quantidade de proteínas. Em seguida adicionou-se 10 μL do tampão fosfato de sódio 0,5 M com NaCl 3 M e EDTA 1,1 mM, então 10 μL de sulfato de Neostigmina 0,76 mM e 4,4'-ditiodipiridina 1 mM (4-PDS). Adiante, incorporou-se as amostras, calculadas para conter 25 μg de proteína, e por último 10 μL de cloreto de colina. Todos esses componentes foram incubados por 5 minutos a 37°C.

Decorrido este período foi adicionado 10 μL de Acetil-CoA em todos os poços e realizado a leitura no espectrofotômetro a 324 nm durante 20 minutos a 37 °C, com intervalo de 30 segundos. A atividade enzimática foi medida pela formação do conjugado 4-tiopiridona (4-TP), produto resultante da ligação da Coenzima A ao 4-PDS. Os resultados foram calculados utilizando o coeficiente de extinção molar de 4-TP, $1,98 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, e expressos em nanomoles.minuto⁻¹. miligrama de proteína⁻¹.

3.4.2 Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)

A determinação da atividade da AChE foi adaptada a partir do método de Ellman e colaboradores (1961) e Rico e colaboradores (2007), sendo determinada pela reação de tiocolina com ditiobisnetrobenzoato, que gera coloração amarela característica. Para esta reação foram utilizados um *pool* de três encéfalos de peixe-zebra por amostra, sendo um total de 6 amostras por grupos e 6 grupos no total. Esses encéfalos foram homogeneizados em um tampão de homogeneização de tris-citrato 250 mM com EDTA 2 mM e EGTA 2 mM, e, em seguida, centrifugados a 1000 rcf por 10 minutos a 4 °C. Após a retirada do sobrenadante, utilizou-se o sedimento para a dosagem de proteína, descrita no item 3.5.

Após os procedimentos descritos, adicionou-se 145 μL de água milli-q em uma microplaca de 96 poços. Posterior a esta etapa, adicionou-se 75 μL de dianion-tiolato (DTNB) preparado no dia com tampão fosfato de potássio 150 mM e bicarbonato de sódio, protegido da luz. A última substância a ser adicionada antes da reação foi 5 μL do sedimento do homogeneizado das amostras.

Antes da adição do substrato (acetilcolina), as amostras e o meio de reação mencionado foram previamente incubados por 10 minutos a 25 °C. Em seguida, adicionou-se nos poços 25 μL de acetilcolina (ACSch, 0,8 mM) para realizar a leitura em espectrofotômetro no método cinético, onde a hidrólise do substrato foi monitorada pela formação de DTNB a 412 nm por 2 minutos e 30 segundos (intervalos de 30 s). Todas as amostras foram feitas em duplicata e a atividade da AChE expressa em micromoles de tiocolina (SCh) liberada por hora por miligrama de proteína.

3.5 AVALIAÇÕES NEUROQUÍMICAS SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

3.5.1 Ensaio do transporte de glutamato

3.5.1.1 Preparação do tecido

Os animais foram anestesiados e posteriormente eutanasiados para dissecação do encéfalo. Os encéfalos foram colocados em placas de 24 poços com 0,5 mL de solução salina balanceada de Hank (HBSS) contendo: NaCl 137mM; Na₂HPO₄ 0,63mM; NaHCO₃ 3,0 mM; KCl 5,36mM; KH₂PO₄ 0,44mM; CaCl₂ 1,26mM; 0,90 mM MgSO₄; glicose 5,55mM; e HEPES 20 mM, pH 7,2. Foram utilizados 9 animais por grupo sendo 4 grupos, totalizando 36 animais.

3.5.1.2 Ensaio de captação de glutamato

O ensaio de captação de glutamato foi realizado conforme descrito anteriormente por Rico e colaboradores (2010). Para avaliação do transporte de glutamato a captação total de glutamato foi medida com a adição de glutamato marcado (0,33 μ Ci mL⁻¹L-[3H]) ao meio de incubação a 37°C. Em todos os ensaios, a captação foi interrompida com duas lavagens subsequentes usando 1 ml de tampão HBSS-HEPES gelado após um período de 7 minutos .

A absorção de glutamato independente de Na⁺ foi medida usando as mesmas condições descritas acima, exceto que N-metil-D-glucamina foi usada no lugar do sódio. O glutamato dependente de Na⁺ foi calculado com a diferença de radioatividade incorporada entre a absorção total de glutamato e a absorção de glutamato independente de Na⁺.

Após os respectivos procedimentos de incubação, o tecido encefálico foi imediatamente transferido para NaOH 0,5 N e incubado durante 24 horas, quando transcorrido esse tempo foi homogeneizado com seu próprio conteúdo. O homogeneizado resultante foi utilizado para dosar proteínas conforme o método descrito no item 3.5 e a radioatividade foi medida por cintilação líquida.

3.6 ESQUIVA INIBITÓRIA

O teste comportamental foi realizado em um aquário específico, com dimensões de 45 cm x 10 cm x 15 cm (comprimento, largura e altura, respectivamente), metade preto e metade branco, com uma porta-guilhotina no meio. Na parte preta possui grades metálicas nas laterais, conectadas a um dispositivo que transmite corrente elétrica de 6V controlada por temporizador ajustável.

O primeiro dia do teste ocorreu em paralelo ao oitavo dia da ERE, após a última exposição ao álcool nos grupos E, EN1 e EN6 e o tratamento com NAC nos grupos N1, N6, EN1, EN6. Foram utilizados 12 animais por grupo e o teste resumiu-se a colocar um peixe por vez no lado branco do aparato, com a porta guilhotina fechada, onde aguardou-se 1 minuto para habituação do animal ao ambiente, após este período a porta foi levantada e um cronômetro acionado no mesmo momento para medir o tempo em que o peixe levou para atravessar da parte branca para a parte preta. Quando o peixe atravessou para o lado preto do aquário, a porta guilhotina foi fechada e um choque de 6 V por 5 segundos foi aplicado. Após isso, cada peixe permaneceu por 30 segundos no lado preto e em seguida foram devolvidos para o aquário moradia correspondente ao seu grupo. Os animais que excederam 3 minutos (180 segundos) para cumprir a tarefa foram descartados do experimento.

O segundo dia do teste avaliou-se a capacidade de memória aversiva do animal. Neste dia, os mesmos passos foram seguidos, exceto a aplicação do choque, pois, no instante em que o peixe atravessou do lado branco para o lado preto o cronômetro registrou o tempo para essa tomada de decisão e então, o animal foi retirado do aparato e eutanasiado imediatamente como ilustrado na figura 2. O tempo cronometrado máximo foi de 10 minutos, se algum animal atingiu este tempo, sem atravessar para o lado preto, os 10 minutos foram considerados o tempo final para o cálculo estatístico.

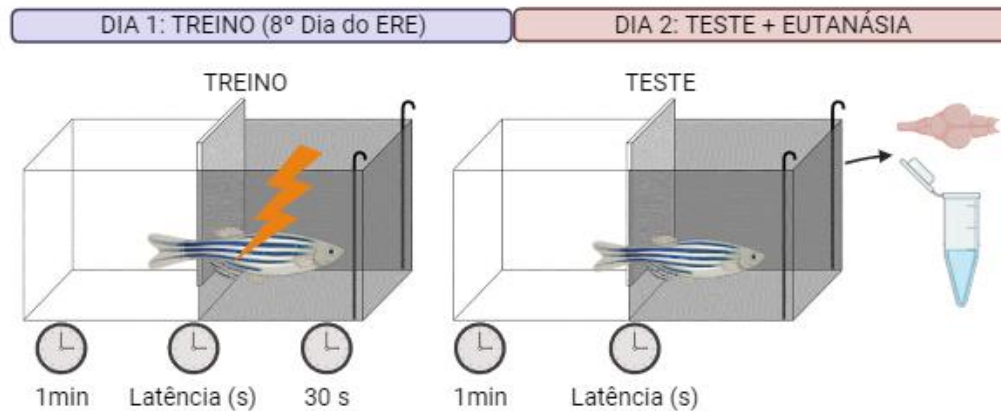


Figura 2: Linha do tempo da esquivinha inibitória. Este experimento dura 2 dias, o primeiro dia é o treino, que inicia após a 8ª exposição ao etanol do protocolo ERE, logo após o treino há o tratamento com NAC nos grupos N1, N6, EN1 e EN6. O dia 2 é o teste, logo após é feita a eutanásia para retirada dos encéfalos.

3.7 RECONHECIMENTO DE OBJETO

O teste comportamental de reconhecimento de objeto foi realizado com base no protocolo de Gasparly e colaboradores (2018). Em um aquário com capacidade para 10 litros e dimensões de 35 cm x 35 cm x 10 cm (comprimento, largura e altura, respectivamente), a parte externa do aquário é revestida em preto para reduzir interferências externas e a profundidade de água usada foi de 6cm. Este experimento ocorreu entre o 5º dia até 1 dia após o protocolo ERE. A primeira parte deste teste foi a habituação, onde, durante três dias (5º ao 7º), os animais foram colocados individualmente no aquário, sem qualquer objeto, para explorarem livremente durante 5 minutos duas vezes ao dia para habituares-se ao ambiente.

Além disso, após a habituação ocorreu o teste, nesse momento metade do aquário permaneceu livre de objetos, enquanto a outra metade foi subdividida em 2 áreas de igual tamanho, onde no centro de cada uma delas foi posicionado um objeto quadrado de dimensões 2cm x 2cm x 2cm, de cor azul. Durante 15 minutos os animais exploraram individualmente os objetos do aquário e o tempo em que permanecerem em cada quadrante de um dos objetos foi cronometrado. Após esta etapa os animais aguardaram um intervalo de retenção de 1 hora para então repetir o procedimento. Desta vez, porém, substituiu-se um dos objetos por outro de mesmo tamanho na cor amarela, o reconhecimento deste novo objeto foi avaliado pelo tempo em que o peixe permaneceu

no seu quadrante correspondente. Um dia após este experimento os animais foram eutanasiados e retirados seus encéfalos utilização na bioquímica. Foram utilizados 12 peixes por grupo e apenas os animais dos grupos C, N1, E e EN1 foram submetidos a este experimento. Os detalhes da realização do teste podem ser visualizados na figura 3.

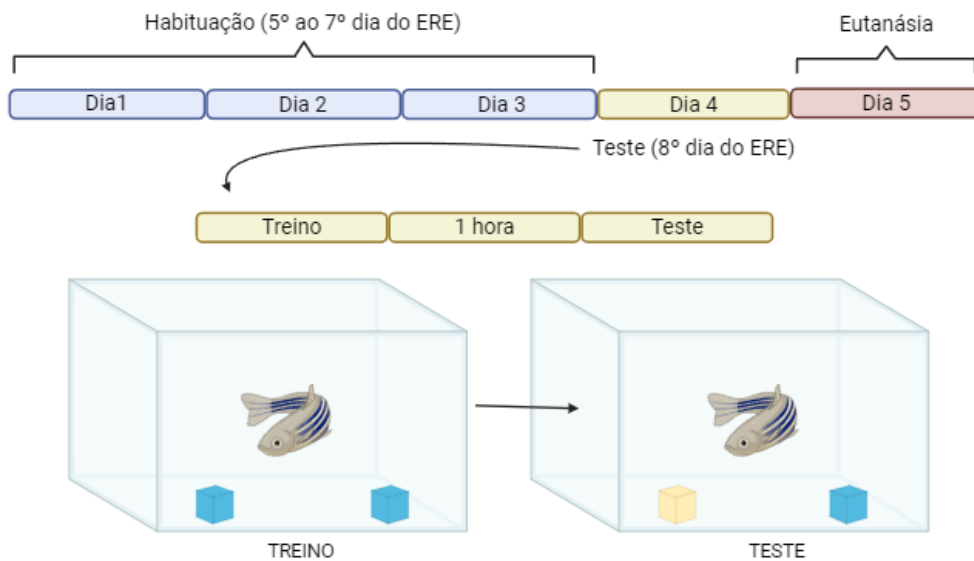


Figura 3: Linha do tempo do teste de reconhecimento de objeto. Os primeiros 3 dias correspondem a fase de habituação dos peixes ao aparato. No dia 4, ocorre o teste, após a última exposição ao etanol e tratamento com NAC onde apresentam-se dois objetos semelhantes e, após o intervalo de retenção, um dos objetos é substituído por outro de cor diferente. A eutanásia ocorre um dia posterior ao teste.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk, com valor de significância (p) definido como 0,05. Se o valor de p obtido foi maior que 0,05, foi aceita a hipótese de nulidade (H_0) e as amostras consideradas paramétricas. Quando comparadas três ou mais médias foi utilizada análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido do teste Post Hoc de Tukey, e os resultados expressos por média \pm desvio padrão. Se o teste de normalidade rejeitou H_0 , os dados não paramétricos foram submetidos ao teste de Wilcoxon quando pareados e o de Kruskal-Wallis seguido pelo teste post-hoc de Dunn quando não pareado. Os dados não paramétricos estão expressos por mediana e intervalo interquartil. As diferenças entre os grupos foram

consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico GraphPad Prism (Boston, Massachusetts, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 SISTEMA COLINÉRGICO

Para compreender os impactos do etanol administrado de forma repetitiva, avaliamos o protocolo de ERE no sistema colinérgico no tecido cerebral do peixe-zebra através da atividade das enzimas de síntese e de degradação da acetilcolina (ChAT e AChE). A atividade enzimática da ChAT não apresentou diferença significativa dentre as múltiplas comparações entre os grupos (Figura 4). No entanto, quando analisada a atividade da enzima AChE (Figura 5), o grupo exposto ao etanol e não tratado com NAC apresentou um aumento significativo em comparação com o grupo controle ($p = 0,0425$). Além disso, o grupo exposto ao etanol e tratado com NAC por 10 minutos apresentou diminuição significativa em relação ao grupo etanol não tratado ($p = 0,0088$).

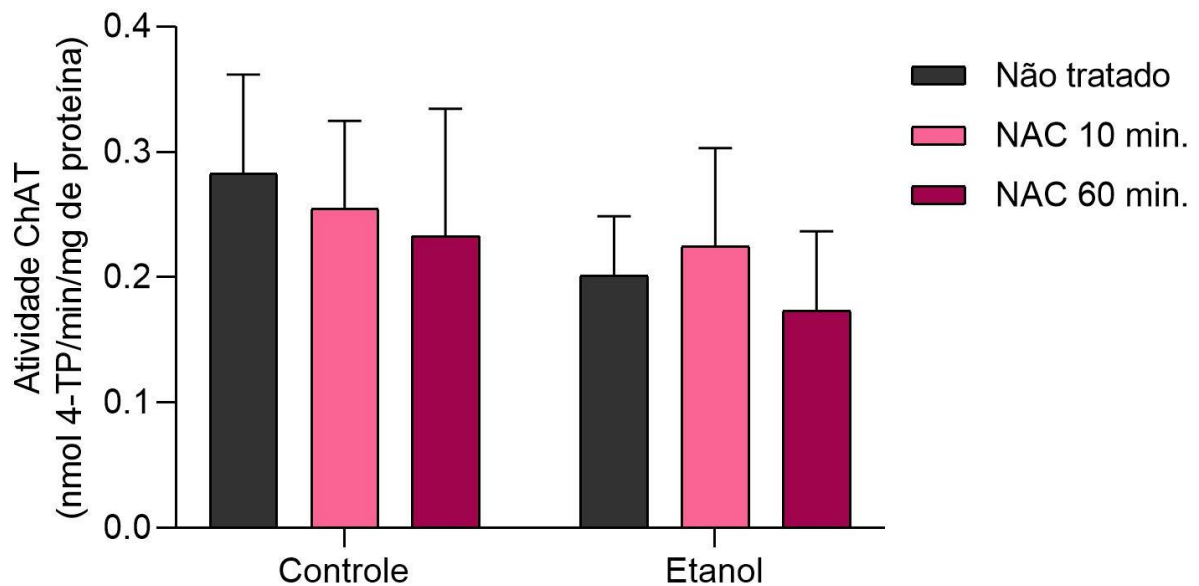


Figura 4: Efeito da ERE nos grupos controle e etanol não tratados e tratados com NAC por 10 minutos ou 60 minutos sobre a atividade da ChAT em encéfalos de peixe-zebra. (Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. Os valores das atividades enzimáticas estão expressos em $\text{nmol 4-TP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. * $p < 0,05$ em múltiplas comparações (ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Tukey)

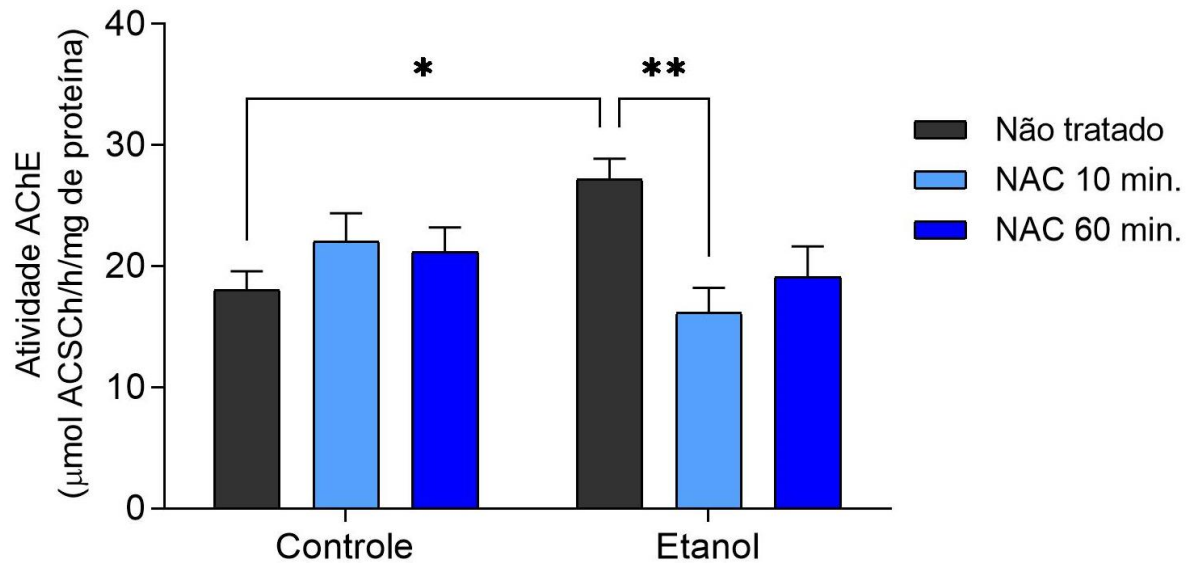


Figura 5: Efeito da ERE nos grupos controle e etanol não tratados e tratados com NAC por 10 minutos ou 60 minutos sobre a atividade da AChE em encéfalos de peixe-zebra. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. Os valores das atividades enzimáticas estão expressos em $\mu\text{mol ACSCh/h/mg}$ de proteína. * $p < 0,05$ em múltiplas comparações (ANOVA de duas vias seguida de post-hoc de Tukey).

4.2 CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO

Ao avaliar os efeitos do ERE no glutamato buscou-se realizar o ensaio de captação de glutamato. Como demonstrado na figura 6, observa-se uma diminuição significativa do grupo etanol em comparação ao grupo controle ($p = 0,0383$). Em contrapartida, ambos os grupos tratados com NAC não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle.

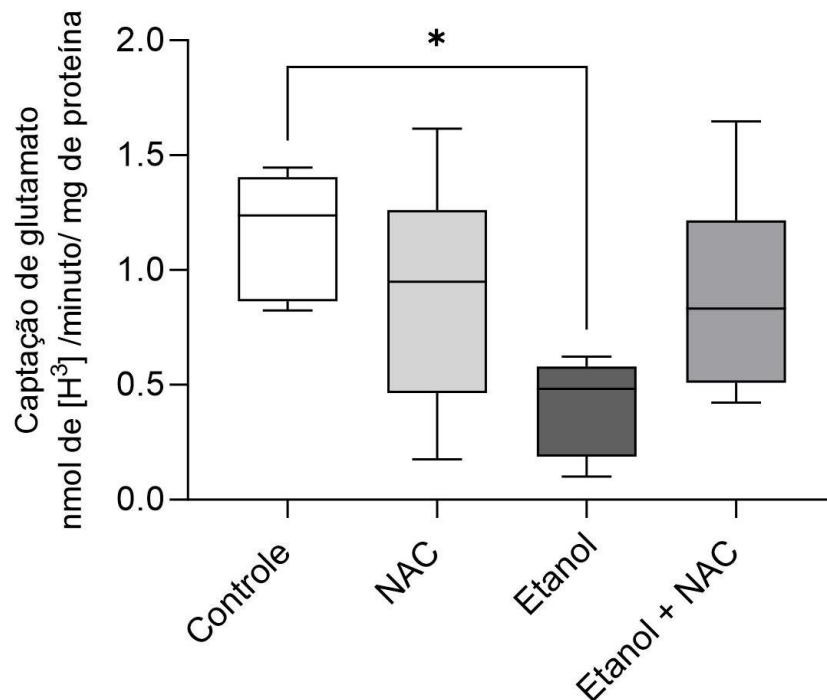


Figura 6: Efeito da ERE e tratamento com NAC sobre a captação de glutamato em encéfalos de peixe-zebra. Os resultados estão expressos em mediana \pm intervalo interquartil. O valor do glutamato captado está expresso em nmol de glutamato marcado por minuto por miligrama de proteína. * $p < 0,05$ em múltiplas comparações (Kruskal-Wallis seguido de post-hoc de Dunn).

4.3 ESQUIVA INIBITÓRIA

Considerando as alterações bioquímicas apresentadas até então, o próximo passo foi avaliar se diferentes tipos de memórias poderiam igualmente demonstrar alterações frente ao efeito do álcool no protocolo de ERE e tratamento com NAC. O primeiro experimento avaliado foi através da memória aversiva, por meio da esQUIVA INIBITÓRIA, no qual trata-se de um teste que verifica se o peixe tem a capacidade de se lembrar de um acontecimento prejudicial vivenciado. O parâmetro avaliado neste experimento é a latência, ou seja, o tempo que o peixe leva para atravessar do lado branco do aquário para o lado preto, e sua comparação com a etapa de treino.

Quando avaliada essa memória verificou-se que o grupo etanol (E) não apresentou diferença significativa, demonstrando uma falha no aprendizado dessa memória (figura 7). No entanto, o grupo controle (C) apresentou aumento significativo no teste ($p = 0,0049$), como também o tratado com NAC por 10 minutos (N1) ($p = 0,0005$); o tratado com NAC por 60 minutos (N6) ($p = 0,0254$); o exposto ao etanol e tratado com NAC por 10 minutos (EN1) ($p = 0,0093$) e o exposto ao etanol e tratado com NAC por 60 minutos (EN6) ($p = 0,0151$).

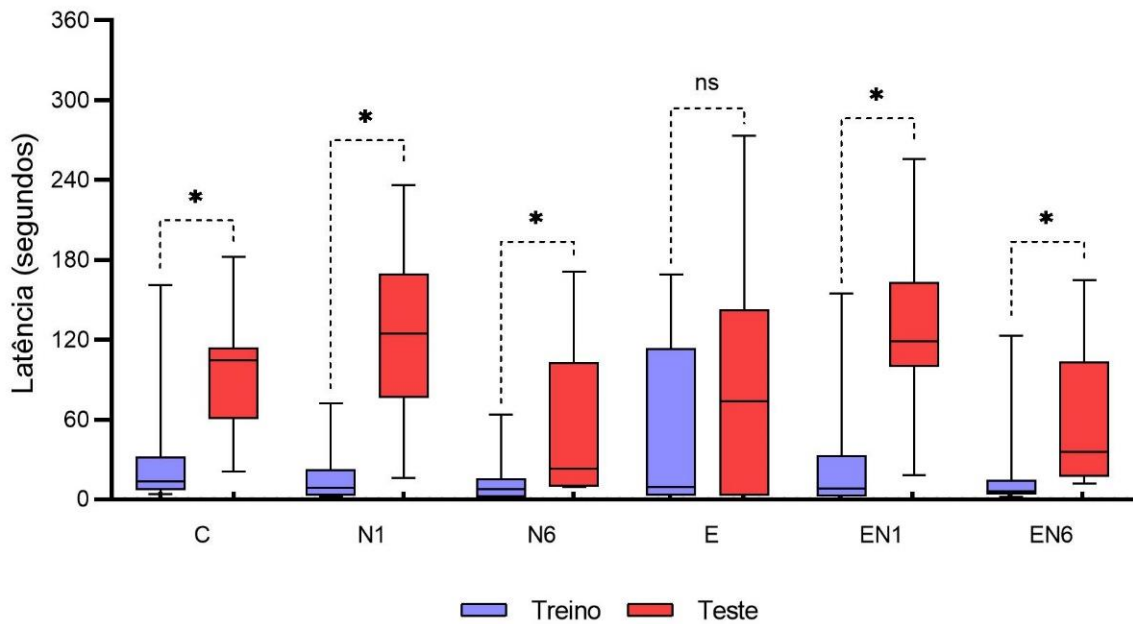


Figura 7: Efeito da ERE sobre a memória aversiva da esquiva inibitória no peixe-zebra. Os resultados estão expressos em mediana \pm intervalo interquartil. O valor da latência está expresso em segundos. * $p < 0,05$ em análise pareada de Wilcoxon.

4.4 RECONHECIMENTO DE OBJETO

No teste de reconhecimento de objeto, avaliou-se os efeitos da ERE e do tratamento com NAC sobre a capacidade do peixe identificar um novo objeto introduzido em seu ambiente. Esta avaliação baseou-se no tempo (em segundos) em que o animal passou no quadrante do aquário do objeto novo como um sinal de que é capaz de identificá-lo como tal. Neste teste o grupo N1 teve um aumento significativo no tempo passado no quadrante do objeto novo (figura 8). Os demais grupos não apresentaram mudança significativa, inclusive o grupo controle.

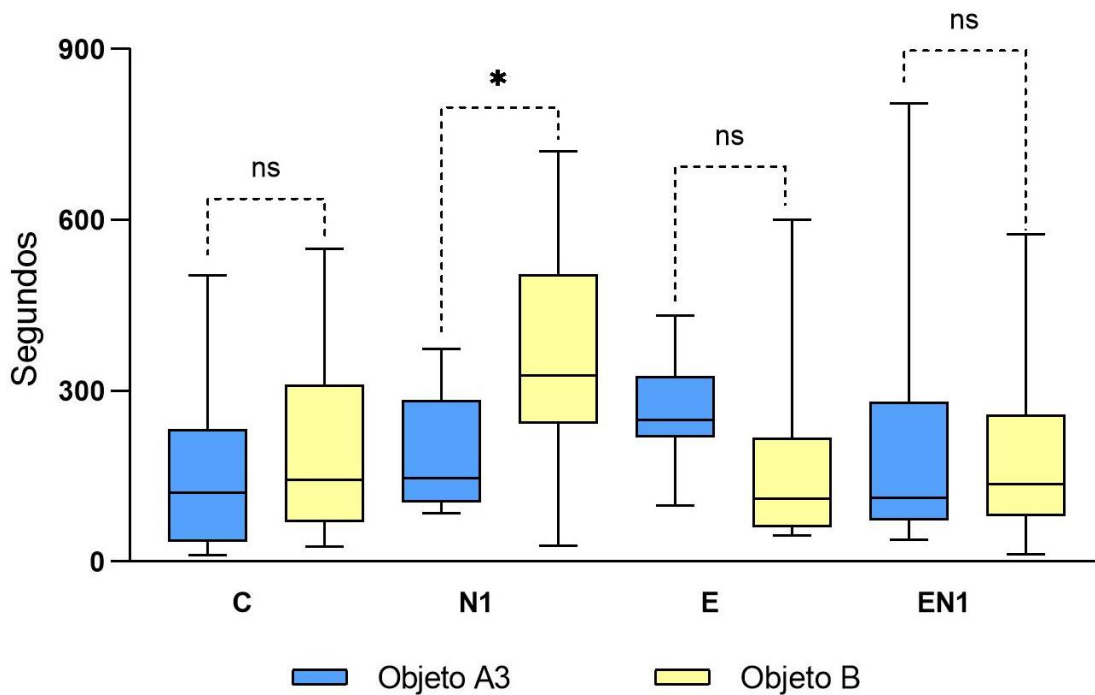


Figura 8: Efeito da ERE sobre a memória de aprendizado no teste de reconhecimento de objeto no peixe-zebra. Os resultados estão expressos em mediana \pm intervalo interquartil. * $p < 0,05$ em análise pareada de Wilcoxon.

5 DISCUSSÃO

O álcool tem sido estudado de forma extensiva nas últimas décadas, pois seu consumo é vasto na humanidade e seus efeitos gerados são igualmente diversos. Existem padrões de consumo e situações de manejo do álcool que geram diferentes efeitos no SNC. Alguns padrões estudados já estabelecidos em peixe-zebra são o uso crônico e o intermitente, tanto semanal (*Weekly-binge*) como diário (ERE), que mimetizam o hábito de consumo humano. Neste estudo investigamos que o ERE associado ao tratamento com NAC promove efeitos neuroquímicos e comportamentais no peixe-zebra.

Considerando as mudanças nos sistemas de neurotransmissão que o etanol pode causar, buscamos avaliar se a ERE atingiria o sistema colinérgico por meio das enzimas de síntese (ChAT) e degradação (AChE) do neurotransmissor acetilcolina. Primeiramente sobre a ChAT não observamos alterações significativas entre os grupos, e, como a atividade desta enzima está diretamente ligada aos níveis de acetilcolina (Agostini et al. 2018), podemos sugerir que este modelo de exposição ao etanol não influenciou a síntese deste neurotransmissor. Para este mesmo organismo, outros tipos de exposição ao etanol promoveram diminuição significativa na atividade da ChAT em tecido cerebral do peixe-zebra (Agostini et al. 2018; Bernardo et al. 2019). No entanto, os resultados obtidos nesses estudos foram através de exposições utilizando maiores concentrações, em um período mais prolongado e com a eutanásia imediatamente após a exposição. Dito isso, no estudo de Bernardo e colaboradores (2019) a diminuição da atividade da ChAT foi expressiva quando a análise dos peixes foi realizada 9 dias após a última exposição ao álcool, mas não na análise feita 2 dias após o *binge*. Com base nisso, sugerimos que o tempo de retirada para eutanásia utilizado no protocolo de nosso estudo, de 24 horas após a última exposição ao etanol, pode ter contribuído para a não alteração da atividade da ChAT, e que análises realizadas em tempos diferentes poderia produzir resultados diversos dessa atividade em nosso estudo, o que iria de encontro a literatura.

Na análise da AChE, encontramos um aumento significativo da atividade promovido pelo etanol. Adicionalmente, 10 minutos de tratamento com NAC foi capaz de diminuir significativamente a atividade da AChE em comparação com o grupo etanol não tratado. Em consonância com outros estudos utilizando o peixe-zebra como modelo

animal para exposição ao etanol, a AChE aumentada é um achado esperado, mas em uma exposição aguda de 1% por um tempo de 1 hora (Rico et al., 2007; Rosemberg et al., 2010; Torres et al., 2021). Sugere-se que, devido aos mecanismos de alteração promovidos pelo álcool serem dose-dependentes, o tempo de exposição menor em relação ao protocolo de exposição aguda pode ter papel direto em nosso resultado.

Juntamente a isso, encontramos a AChE diminuída no grupo etanol tratado com NAC por 10 minutos. No estudo de Rosemberg e colaboradores (2010) o uso concomitante da taurina junto a exposição ao álcool preveniu o aumento exacerbado da AChE nos peixes expostos ao etanol. A taurina é um aminoácido endógeno que, assim como a NAC, modula a atividade neuronal, regulando o balanço excitatório/ inibitório de sistemas de neurotransmissão e estimulando sistemas antioxidantes. Como um agonista do GABA, este também é capaz de influenciar na diminuição do glutamato extracelular (Rafiee et al., 2022). Em um estudo com roedores, a NAC reverteu o aumento da AChE e atenuou o comprometimento cognitivo no reconhecimento de objeto em um modelo de dano cognitivo induzido por estreptozotocina (da Costa et al., 2017). Além disso, em um modelo de doença neuro metabólica recessiva, a NAC junto a deferoxamina reverteram parcialmente o aumento excessivo de AChE causado pela doença (Gomes et al., 2018). Em suma, os nossos resultados do sistema colinérgico, pela primeira vez, esclarecem a capacidade parcial que a NAC possui em reverter danos causados pela ERE no peixe-zebra após uma única administração de 10 minutos. Novos estudos com doses e tempos de exposição diferentes são necessários para elucidar se a NAC é capaz de produzir efeitos mais robustos.

Seguimos com as análises bioquímicas através da captação do glutamato. O resultado encontrado foi uma diminuição significativa no grupo etanol em relação ao controle. O grupo NAC e o tratado com NAC e exposto ao etanol não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle. Sabe-se que o glutamato é um dos principais neurotransmissores afetados pelo álcool e está relacionado aos mecanismos de tolerância e dependência (Bell et al., 2016; Abrahao et al., 2017). No uso agudo de álcool o sistema GABAérgico é estimulado e o glutamatérgico inibido, mas em situações de uso prolongado as neuro-adaptações invertem o balanço desses sistemas, sendo

capaz de promover uma hiperexcitação glutamatérgica se o etanol é retirado do organismo (Atilia et al., 2018; Carvalho et al., 2019).

A ERE no peixe-zebra, primeiramente proposta por Mathur e Guo (2011), tem como objetivo chegar a uma concentração de etanol no cérebro do peixe com um efeito semelhante aos hábitos dos humanos, desta forma, essa exposição é mais prolongada em relação a protocolos agudos, mas em um tempo de exposição menor em relação aos protocolos crônicos existentes para o peixe-zebra. Dito isso, os resultados encontrados no presente trabalho evidenciam a capacidade do etanol alterar o sistema glutamatérgico, causando uma diminuição da atividade dos transportadores de glutamato similar a encontrada em estudos com exposição *in vitro* e exposição crônica no peixe-zebra (Zenki et al., 2014; Vizuetta et al., 2022).

Ademais, o nosso resultado da captação de glutamato mostra pela primeira vez a efetividade do tratamento com NAC, sendo capaz de reestabelecer os níveis normais frente a diminuição da atividade de transporte sódio-dependente após a exposição ao etanol. Tendo em vista que a NAC é um antioxidante e doador de cisteína para o sistema da glutathione, pode-se pensar que ela desempenha um papel importante na recuperação do sistema glutamatérgico. Em um estudo de ERE no peixe-zebra, o etanol foi capaz de alterar parâmetros do estresse oxidativo tais como a atividade da superóxido dismutase, catalase, glutathione-S-transferase e peroxidação lipídica (Muller et al., 2017). Essas alterações foram posteriormente revertidas pelo uso NAC na mesma concentração de nosso estudo, porém usada concomitantemente a exposição ao álcool (Mocelin et al., 2019). A NAC também foi capaz de agir de forma protetora antes de uma exposição aguda ao etanol, mantendo normais os níveis de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico e de tióis não proteicos (Mocelin et al., 2018). Dito isso, sabe-se que a NAC, doando sua cisteína, torna possível a síntese de cistina, que regula o glutamato extracelular por meio de transportadores que o trocam com a cistina intracelular e interage com o sistema da glutathione. Todo esse sistema está ligado aos mecanismos do uso de substâncias e doenças psiquiátricas (Slattery et al., 2015; Smaga et al., 2021). O etanol, através da sua via de degradação, principalmente no fígado, é capaz de promover por meio de seus metabólitos acetaldeído e acetato efeitos indiretos tanto sistemicamente como também no SNC. O acetaldeído, como primeiro metabólito desta via de degradação, destaca-se

por mediar muitos dos efeitos tóxicos indiretos, gerando diversas alterações neuroquímicas e farmacológicas promovidas pelo etanol. Tais características advêm do fato de este aldeído ser uma molécula altamente reativa, que pode formar complexos com proteínas e outros componentes biológicos, formando aductos (Niemela, 2001). Outro efeito indireto do acetaldeído está relacionado com a geração de espécies reativas. Trata-se de uma molécula simples, que atravessa facilmente a barreira hematoencefálica e que apresenta características neurotóxicas através de dano oxidativo, lipídico e, conseqüentemente na homeostase celular (Fein e Meyerhoff, 2000).

Neste sentido, considerando que o protocolo de ERE aplicado já é estabelecido por gerar efeitos em parâmetros de estresse oxidativo, bem como alterar as defesas antioxidantes em tecido cerebral de peixe-zebra, pode-se sugerir que tais efeitos possam estar relacionados com as propriedades pró-oxidativas do acetaldeído. Assim, os achados relacionados ao efeito do ERE tanto para os parâmetros relacionados a atividade da AChE como também na captação de glutamato podem estar relacionados aos efeitos indiretos, tanto associados à disruptura do balanço oxidativo cerebral promovidos pelo etanol, como também pelo acetaldeído. Além do mais, considera-se importante destacar que o efeito da NAC frente ao protocolo do ERE atenuou tais parâmetros. Portanto, este conjunto de evidências permite sugerir que tais efeitos possam estar atribuídos a uma potencial propriedade antioxidante da NAC mitigando os efeitos tóxicos do etanol. Estes achados contribuem para uma compreensão mais completa do funcionamento da NAC e seus mecanismos antioxidantes e protetores frente aos sistemas colinérgico e glutamatérgico relacionados a exposição ao álcool no peixe-zebra.

A partir de nossas análises bioquímicas ficou evidenciado que AChE e a captação de glutamato são prejudicadas pelo ERE e que um tratamento único com NAC por 10 minutos é capaz de reverter esses danos. Sabe-se ainda que os sistemas colinérgico e glutamatérgico estão relacionados a processos de memória e aprendizado (Armstrong et al., 1968; Petroff, 2002; Tapiero et al. 2002; Picciotto et al., 2012; Ferreira-Vieira et al., 2016; Bell et al., 2016; Haam e Yakel, 2017). Então, decidimos verificar se o ERE é capaz de prejudicar a memória e se a NAC pode trazer um efeito protetor frente a isso no peixe-zebra, através da esquivia inibitória e reconhecimento de objeto.

A esquivia inibitória é uma tarefa comportamental que visa determinar se o peixe-zebra apresenta a capacidade de reter uma memória aversiva, neste caso o choque elétrico. Essa aferição é realizada por meio da comparação dos tempos de latência entre o treino e o teste de cada grupo. Um peixe que recebe uma descarga elétrica ao nadar até o lado preto do aquário durante o treino supostamente lembra-se desta condição ao ser apresentado ao mesmo ambiente no dia posterior. Essa lembrança é denominada como memória aversiva, e essa memória é considerada preservada se o peixe demorar mais tempo para atravessar para o lado preto em relação ao dia anterior.

Em nosso experimento verificamos que todos os grupos tiveram a capacidade de reter esse tipo de memória aversiva de forma significativa, exceto o grupo exposto ao etanol. Já é bem estabelecido que diferentes formas de exposição ao álcool afetam diversos comportamentos do peixe-zebra, tais como a convivência social, a exploração espacial, o comportamento do tipo ansiedade e memórias de aprendizado, como a memória aversiva por esquivia inibitória (Gerlai et al., 2000; Gerlai et al., 2006; Amorim et al., 2017; Muller et al., 2017; Mocelin et al., 2018). No entanto, o resultado promissor que este experimento nos trouxe é a capacidade da NAC em reverter os danos causados pela ERE nessa memória aversiva, pois ambos os grupos expostos ao etanol e tratados com NAC por 10 e 60 minutos preservaram a capacidade de retenção desta memória.

A NAC já demonstrou sua capacidade de reverter danos causados por estresse agudo e crônico no peixe-zebra (Mocelin et al., 2015; Mocelin et al., 2018). Além disso, o compartimento branco do aparato da esquivia já é considerado um estímulo aversivo para o peixe, sendo capaz de gerar comportamento similar a ansiedade (Santos et al., 2019). Outro estudo verificou que o choque aplicado aumenta de forma significativa os níveis séricos de cortisol (Manuel et al., 2014). Ademais, estudos com ratos demonstraram que a NAC junto a deferoxamina foi capaz de preservar a memória aversiva da esquivia inibitória em modelo de sepse e da doença da urina de xarope de bordo (Barichello et al., 2007; Scaini et al., 2012). Dito isso, é possível afirmar que a NAC age de forma protetora frente a danos diversos que impactam a memória aversiva, incluindo a ERE no peixe-zebra.

A partir dos achados obtidos da esquivia inibitória seguimos para o teste de reconhecimento de objeto, um tipo de tarefa comportamental que busca identificar se o

peixe tem a capacidade de percepção de novos objetos em seu ambiente. Neste experimento o grupo N1 apresentou capacidade de reconhecer o objeto novo, mas este resultado não foi replicado pelos outros grupos, inclusive pelo controle. A capacidade do peixe-zebra em reconhecer objetos já foi extensamente estudada, tendo elucidado que o peixe não tem preferência por formatos ou localização de objetos, mas sabe reconhecer diferentes cores, em especial a azul e a amarela (Braidá et al., 2014; Lucon-Xiccato e Dadda 2014; Oliveira et al., 2015; May et al., 2016; Gasparly et al., 2018; Pinheiro-da-Silva et al., 2017). No protocolo de Gasparly e colaboradores (2018), utilizado por nós, os peixes do grupo controle apresentaram uma maior preferência pelo objeto novo, mas isso não se manteve em peixes submetidos a estresse agudo de manipulação. Juntamente a isto, o estudo de Pinheiro da Silva (2017) também não encontrou diferenças significativas na exploração do objeto novo em relação ao objeto familiar em peixes submetidos a privação de sono, uma tarefa também considerada estressora. Com base nisso é possível afirmar que o estresse é um fator que influencia diretamente na capacidade do peixe em explorar de forma significativa um objeto novo. Também podemos questionar se a manipulação excessiva do peixe em nosso estudo, desde a fase de habituação, o deixou suscetível ao estresse, visto que é um manejo que pode variar dependendo do indivíduo que a executa, aumentando o tempo de manipulação do animal e causando consequências variáveis em seu comportamento.

Ademais, os grupos expostos ao etanol (E, EN1) também não apresentaram diferenças na exploração. Esses resultados estão de acordo com o estudo de Santos e colaboradores (2016), onde a exposição aguda ao álcool e a retirada pós exposição crônica impactou na exploração do objeto novo pelo peixe zebra, além disso, os expostos de forma aguda ao etanol apresentaram maior tempo de *freezing*, um comportamento caracterizado como similar a ansiedade, que pode diminuir a propensão do peixe a se expor a situações de risco, como a exploração de um objeto novo. Além disso, o único grupo que apresentou um comportamento de maior exploração ao objeto novo foi o N1, podendo sugerir algum efeito protetor da NAC frente ao estresse de manejo do animal, no entanto, como não avaliamos parâmetros relacionados a isso, tal sugestão requer uma análise mais aprofundada deste protocolo experimental e os possíveis efeitos que a NAC pode promover no peixe-zebra nesse quesito. Em um estudo com ratos, a NAC promoveu

um efeito protetor ao dano na memória de reconhecimento de objeto causado por uma dieta rica em gorduras, que tem forte efeito oxidante, além disso reestabeleceu os níveis de glutathione e modulou as interações entre glutamato e glutamina, aumentando os níveis de glutamato e gaba (Garcia-Serrano et al., 2023).

Nesse viés, a NAC, apesar de não ser considerada o mais potente dos antioxidantes, tem grande potencial quando utilizada em situações que necessitam da reversão do estresse oxidativo, servindo como substrato para a glutathione (Rushworth e Megson, 2014). Assim, a NAC pode ter sido o suficiente para atenuar o estresse de manipulação do grupo N1, mas não o necessário para também reparar o dano adicional de exposição ao etanol do grupo EN1. Considerando isso, é possível questionar se doses ou tempos de exposição diferentes podem produzir resultados mais significativos sobre os efeitos da NAC.

Tomados em conjunto, os resultados do presente estudo abrem possibilidades para estudar novos mecanismos pelo qual a NAC possa estar envolvida na formação e consolidação da memória. Considerando o peixe -zebra um organismo candidato para a varredura de compostos neuro protetores, este estudo potencializa, através deste organismo alternativo, ampliar perspectivas pré-clínicas por meio de protocolos bioquímicos e moleculares complementares.

6 CONCLUSÃO

Em síntese, este estudo, por meio de análises bioquímicas e comportamentais demonstrou, pela primeira vez, efeitos da NAC após a ERE na neurotransmissão colinérgica e glutamatérgica, como também aspectos comportamentais no peixe-zebra. Dentre os resultados obtidos, destaca-se o aumento da AChE promovido pelo etanol e revertido pela NAC administrada por 10 minutos. Da captação de glutamato, prejudicada pelo etanol e reestabelecida pelo tratamento com NAC por 10 minutos, evidenciando uma possível atuação deste fármaco como antioxidante frente ao dano oxidativo causado pelo etanol na neurotransmissão, como também abrindo novas reflexões acerca da forma de administração da NAC frente a exposição ao etanol. Além disso, também é possível evidenciar a atuação da NAC em garantir a aprendizagem da memória aversiva na esQUIVA inibitória prejudicada pelo etanol. Em suma o tratamento com NAC, principalmente por 10 minutos, demonstrou resultados importantes na captação de glutamato e na memória aversiva. Com isso, os resultados esclarecem e abrem possibilidades para estudar novos mecanismos pelos quais a NAC possa estar envolvida na formação e consolidação da memória e na proteção frente a exposição ao álcool no peixe-zebra.

7 REFERÊNCIAS

Abraham KP, Salinas AG, Lovinger DM. Alcohol and the brain: neuronal molecular targets, synapses, and circuits. *Neuron*. 2017;96(6):1223-1238.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BR). Registro de Medicamento. Disponível em: http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentosPersistir.

Agostini JF, Toé HCZD, Vieira KM, Baldin SL, Costa NLF, Cruz CU, Longo L, Machado MM, da Silveira TR, Schuck PF, Rico EP. Cholinergic system and oxidative stress changes in the brain of a zebrafish model chronically exposed to ethanol. *Neurotox Res*. 2018;33:749-758.

Alexandre MCM, Mendes NV, Torres CA, Baldin SL, Bernardo HT, Scussel R, Baggio S, Mussulini BHM, Zenki KC, da Rosa MI, Rico EP. Weekly ethanol exposure alters dopaminergic parameters in zebrafish brain. *Neurotox Teratol*. 2019;75: 106822.

Amorim RR, Silva PF, Luchiari AC. Effects of Alcohol on Inhibitory Avoidance Learning in Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*. 2017;14(5):430-437.

Armstrong DM, Saper CB, Levey AI, Wainer BH, Terry RD. Distribution of cholinergic neurons in rat brain: demonstrated by the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase. *J Comp Neurol*. 1983;216:53-68.

Asok A, Leroy F, Rayman JB, Kandel ER. Molecular mechanisms of the memory trace. *Trends Neurosci*. 2019;42(1):14-22.

Attilia F, Perciballi R, Rotondo C, Capriglione I, Iannuzzi S, Attilia ML, Coriale G, Vitali M, Cereatti F, Fiore M, Ceccanti M. Alcohol withdrawal syndrome: diagnostic and therapeutic methods. *Rivista di psichiatria*. 2018;53(3):118-122.

Back SE, Gray K, Santa Ana E, Jones JL, Jarnecke AM, Joseph JE, Prisciandaro J, Killeen T, Brown DG, Taimina L, Compean E, Malcolm R, Flanagan JC, Kalivas PW. N-acetylcysteine for the treatment of comorbid alcohol use disorder and posttraumatic stress disorder: Design and methodology of a randomized clinical trial. *Contemp clin trials*. 2020;91:105961.

Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem*. 2006;98(3):641-653.

Barichello T, Machado RA, Constantino L, Valvassori SS, Réus GZ, Martins MR, Petronilho F, Ritter C, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Antioxidant treatment prevented late memory impairment in an animal model of sepsis. *Crit care med*. 2017;35(9):2186-2190.

Bavarsad Shahripour R, Harrigan MR, Alexandrov AV. N-acetylcysteine (NAC) in neurological disorders: mechanisms of action and therapeutic opportunities. *Brain and behavior*. 2014;4(2):108-122.

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(2):111-8.

Bell RL, Hauser SR, McClintick J, Rahman S, Edenberg HJ, Szumlinski KK, & McBride WJ. Ethanol-associated changes in glutamate reward neurocircuitry: a minireview of clinical and preclinical genetic findings. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2016;137:41-85.

Bernardo HT, Agostini JF, Dal Toé HCZ, Vieira KM, Baldin SL, Schuck PF, Cruz CU, Longo L, da Silveira TR, Rosemberg DB, Rico EP. Cholinergic system and exploratory behavior are changed after weekly-binge ethanol exposure in zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav*. 2019;186:172790.

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(4):529-34.

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(3):481-93.

Braida D, Ponzoni L, Martucci R, Sala M. A new model to study visual attention in zebrafish. *Progress in Neuro-Psychopharm and Biol Psych*. 2014;55:80-86.

Brown RM, Kupchik YM, Kalivas PW. The story of glutamate in drug addiction and of N-acetylcysteine as a potential pharmacotherapy. *Jama Psychiatry*. 2013;70(9):895-897.

Carvalho AF, Heilig M, Perez A, Probst C, Rehm J. Alcohol use disorders. *The Lancet*. 2019;394(10200):781-792.

Chao LP, Wolfgram F. Purification and some properties of choline acetyltransferase (EC 2.3.1.6) from bovine brain. *J Neurochem*. 1973;20(4):1075-1081.

Christian DT, Alexander NJ, Diaz MR, and McCool BA. Thalamic glutamatergic afferents into the rat basolateral amygdala exhibit increased presynaptic glutamate function following withdrawal from chronic intermittent ethanol. *Neuropharmacol*. 2013;65:134-142.

Cohen SM, Alexander RS, Holt SR. The spectrum of alcohol use: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Medical Clinics*. 2022;106(1):43-60.

Costardi JVV, Nampo RAT, Silva GL, Ribeiro MAF, Stella HJ, Stella MB, Malheiros SVP. A review on alcohol: from the central action mechanism to chemical dependency. *Rev Assoc Med Bras.* 2015;61:381-387.

Costa M, Bernardi J, Fiuza T, Costa L, Brandão R, Pereira ME. N-acetylcysteine protects memory decline induced by streptozotocin in mice. *Chemico-biological interact.* 2016;253:10-17.

da Costa M, Bernardi J, Costa L, Fiuza T, Brandao R, Ribeiro MF, Amaral JD, Rodrigues CMP, Pereira ME. N-acetylcysteine treatment attenuates the cognitive impairment and synaptic plasticity loss induced by streptozotocin. *Chem-Biol Inter.* 2017;272:37-46.

Duailibi MS, Cordeiro Q, Brietzke E, Ribeiro M, LaRowe S, Berk M, Trevizol AP. N-acetylcysteine in the treatment of craving in substance use disorders: Systematic review and meta-analysis. *Am J Addict.* 2017;26(7):660-666.

Edwards JG, Michel WC. Odor-stimulated glutamatergic neurotransmission in the zebrafish olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 2002;454(3):294-309.

Egervari G, Siciliano CA, Whiteley EL, Ron D. Alcohol and the brain: from genes to circuits. *Trends Neurosci.* 2021;44(12):1004-1015.

Elliott M, Terrett G, Curran HV, De Bono N, Rendell PG, Henry JD. Prospective memory deficits following acute alcohol consumption. *J Psychopharmacol.* 2021;35(11):1386-1397.

Ellman GL, Courtney KD, Andres V jr, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961;7:88–95.

Fein G, Meyerhoff DJ. Ethanol in human brain by magnetic resonance spectroscopy: correlation with blood and breath levels, relaxation, and magnetization transfer. *Alcohol Clin Exp Res.* 2000;24(8):1227–35.

Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM. Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system. *Curr neuropharmacol.* 2016;14(1):101-115.

Froehlicher M, Liedtke A, Groh KJ, Neuhaus SC, Segner H, Eggen RI. Zebrafish (*Danio rerio*) neuromast: promising biological endpoint linking developmental and toxicological studies. *Aquat Toxicol.* 2009;95(4):307-19.

Garcia-Serrano AM, Vieira JP, Fleischhart V, Duarte JM. Taurine and N-acetylcysteine treatments prevent memory impairment and metabolite profile alterations in the hippocampus of high-fat diet-fed female mice. *Nutritional Neurosci.* 2023;26(11):1090-1102.

Gasparly KV, Reolon GK, Gusso D, Bonan CD. Novel object recognition and object location tasks in zebrafish: Influence of habituation and NMDA receptor antagonism. *Neurobiol of Learning and Memory*. 2018;155:249-260.

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(4):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(4):752–761.

Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol*. 2004;4(5):504-12.

Gomes LM, Scaini G, Carvalho-Silva M, Gomes ML, Malgarin F, Kist LW, Bogo MR, Rico EP, Zugno AI, Derosa PFP, Réus GZ, de Moura AD, Quevedo J, Ferreira GC, Schuck PF, Streck EL. Antioxidants reverse the changes in the cholinergic system caused by L-tyrosine Administration in Rats. *Neurotox Res*. 2018;34:769-780.

Goncalves JF, Fiorenza AM, Spanevello RM, Mazzanti CM, Bochi GV, Antes FG, Stefanello N, Rubin MA, Dressler VL, Morsch VM, Schetinger MRC. N-acetylcysteine prevents memory deficits, the decrease in acetylcholinesterase activity and oxidative stress in rats exposed to cadmium. *Chemico-biological interact*. 2010;186(1):53-60.

Griffin WC III, Haun HL, Hazelbaker CL, Ramachandra VS, Becker HC. Increased extracellular glutamate in the nucleus accumbens promotes excessive ethanol drinking in ethanol dependent mice. *Neuropsychopharmacol*. 2014;39:707–717.

Gutwinski S, Schreiter S, Priller J, Henssler J, Wiers CE, Heinz A. Drink and think: impact of alcohol on cognitive functions and dementia—evidence of dose-related effects. *Pharmacopsychiatry*. 2018;51(04):136-143.

Haam J, Yakel JL. Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. *J neurochem*. 2017;142:111-121.

Hendrickson LM, Guildford MJ, Tapper AR. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: common molecular substrates of nicotine and alcohol dependence. *Front psychiatry*. 2013;4: 29.

Horzmann KA, Freeman JL. Making Waves: New Developments in Toxicology With the Zebrafish. *Toxicol Sci*. 2018;163(1):5-12.

Kalueff AV, Stewart AM, Gerlai R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol Sci*. 2014;35(2):63-75.

Kamal H, Tan GC, Ibrahim SF, Shaikh MF, Mohamed IN, Mohamed RMP, Hamid AA, Ugusman A, Kumar J. Alcohol use disorder, neurodegeneration, Alzheimer's and

Parkinson's disease: Interplay between oxidative stress, neuroimmune response and excitotoxicity. *Front Cell Neurosci.* 2020;14: 282.

Kaslin J, Panula P. Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol.* 2001;440(4):342-77.

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(1-2):29-32.

Kucenas S, Li Z, Cox JA, Egan TM, Voigt MM. Molecular characterization of the zebrafish P2X receptor subunit gene family. *Neuroscience.* 2003;121(4):935-45.

Laguesse S, Morisot N, Shin JH, Liu F, Adrover MF, Sakhai SA, Lopez MF, Phamluong K, Griffin III WC, Becker HC, Bender KJ, Alvarez VA, Ron D. Prosapip1-dependent synaptic adaptations in the nucleus accumbens drive alcohol intake, seeking, and reward. *Neuron.* 2017;96(1):145-159.

Lees B, Meredith LR, Kirkland AE, Bryant BE, Squeglia LM. Effect of alcohol use on the adolescent brain and behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 2020;192: 172906.

Loftén A, Adermark L, Ericson M, Söderpalm B. An acetylcholine-dopamine interaction in the nucleus accumbens and its involvement in ethanol's dopamine-releasing effect. *Addict Biol.* 2021;26(3):e12959.

Lowry OH, Rosebrought NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-267.

Lucon-Xiccato T, Dadda M. Assessing memory in zebrafish using the one-trial test. *Behav processes.* 2014;106:1-4.

MacRae CA, Peterson RT. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature reviews Drug Discovery.* 2015;14(10):721-731.

Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

Manuel R, Gorissen M, Piza Roca C, Zethof J, Vis HVD, Flik G, Bos RVD. Inhibitory avoidance learning in zebrafish (*Danio rerio*): effects of shock intensity and unraveling differences in task performance. *Zebrafish.* 2014;1(4):341-352.

Mathur P, Guo S. Differences of acute versus chronic ethanol exposure on anxiety-like behavioral responses in zebrafish. *Behav brain res.* 2011;219(2):234-239.

May Z, Morrill A, Holcombe A, Johnston T, Gallup J, Fouad K, Schalomon M, Hamilton TJ. Object recognition memory in zebrafish. *Behav brain res.* 2016;296:199-210.

McClain JA, Morris SA, Marshall SA, Nixon K. Ectopic hippocampal neurogenesis in adolescent male rats following alcohol dependence. *Addict Biol.* 2014;19(4):687-699.

McClure EA, Gipson CD, Malcolm RJ, Kalivas PW, Gray KM. Potential role of N-acetylcysteine in the management of substance use disorders. *CNS Drugs.* 2014;28:95-106.

Mocelin R, Herrmann AP, Marcon M, Rambo CL, Rohden A, Bevilaqua F, de Abreu MS, Zanatta L, Elisabetsky E, Barcellos LJ, Lara DR, Piato AL. N-acetylcysteine prevents stress-induced anxiety behavior in zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav.* 2015;139 Pt B:121-6.

Mocelin R, Marcon M, D'ambros S, Herrmann AP, da Rosa Araujo AS, Piato A. Behavioral and Biochemical Effects of N-Acetylcysteine in Zebrafish Acutely Exposed to Ethanol. *Neurochem Res.* 2018;43(2):458-464.

Mocelin R, Marcon M, da Rosa Araujo AS, Herrmann AP, Piato A. Withdrawal effects following repeated ethanol exposure are prevented by N-acetylcysteine in zebrafish. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2019;93:161-170.

Müller TE, Fontana BD, Bertencello KT, Franscescon F, Mezzomo NJ, Canzian J, Stefanello FV, Parker MO, Gerlai R, Rosemberg DB. Understanding the neurobiological effects of drug abuse: Lessons from zebrafish models. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2020;100:109873.

Müller TE, Nunes SZ, Silveira A, Loro VL, Rosemberg DB. Repeated ethanol exposure alters social behavior and oxidative stress parameters of zebrafish. *Progress Neuro Psychopharm Biol Psychiatry.* 2017;79:105-111.

Ministério da Saúde (BR), Linhas de cuidado, Transtornos Por Uso De Álcool No Adulto. Disponível em: <https://linhasdecuidado.saude.gov.br/portal/transtornos-por-uso-de-alcool-no-adulto/definicao/>

National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (US). Alcohol's Effects on Health. 2023. Disponível em: <https://www.niaaa.nih.gov/alcohol-health/overview-alcohol-consumption/moderate-binge-drinking>

Niemela O. Distribution of ethanol-induced protein adducts in vivo: relationship to tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 2001;31:1533-8.

Norberg Å, Jones AW, Hahn RG, Gabrielsson JL. Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics: research and forensic applications. *Clin pharmacokinet.* 2003;42:1-31.

Oliveira J, Silveira M, Chacon D, Luchiari A. The zebrafish world of colors and shapes: preference and discrimination. *Zebrafish.* 2015;12(2):166-173.

Opitz B. Memory function and the hippocampus. *The hippocampus clin neurosci*. 2014;34:51-59.

Palmer E, Tyacke R, Sastre M, Lingford-Hughes A, Nutt D, Ward RJ. Alcohol hangover: Underlying biochemical, inflammatory and neurochemical mechanisms. *Alcohol and alcohol*. 2019;54(3):196-203.

Petroff OA. Book review: GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist*. 2002;8(6):562-573.

Picciotto M R, Higley MJ, Mineur YS. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*. 2012;76(1):116-129.

Pinheiro-da-Silva J, Silva PF, Nogueira MB, Luchiari AC. Sleep deprivation effects on object discrimination task in zebrafish (*Danio rerio*). *An cogn*. 2017;20:159-169.

Policy Regarding N-acetyl-L-cysteine: Guidance for Industry. Food and Drug Administration. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-policy-regarding-n-acetyl-l-cysteine>.

Quintanilla ME, Ezquer F, Morales P, Ezquer M, Olivares B, Santapau D, Herrera-Marschitz M, Israel Y. N-Acetylcysteine and acetylsalicylic acid inhibit alcohol consumption by different mechanisms: combined protection. *Front Behav Neurosci*. 2020;14:122.

Rafiee Z, García-Serrano AM, Duarte JM. Taurine supplementation as a neuroprotective strategy upon brain dysfunction in metabolic syndrome and diabetes. *Nutrients*. 2022;14(6):1292.

Rahman S, Prendergast AM. Cholinergic receptor system as a target for treating alcohol abuse and dependence. *Recent Pat CNS Drug Discov (Discontinued)*. 2012;7(2):145-150.

Reus VI, Fochtmann LJ, Bukstein O, Eyler AE, Hilty DM, Horvitz-Lennon M, Mahoney J, Pasic J, Weaver M, Wills CD, McIntyre J, Kidd J, Yager J, Hong, S. H. The American Psychiatric Association practice guideline for the pharmacological treatment of patients with alcohol use disorder. *American J Psychiatry*. 2018;175(1):86-90.

Rico EP, de Oliveira DL, Rosemberg DB, Mussulini BH, Bonan CD, Dias RD, Wofchuk S, Souza DO, Bogo, MR. Expression and functional analysis of Na(+)-dependent glutamate transporters from zebrafish brain. *Brain Res Bull*. 2010;81(4-5):517-23.

Rico EP, Rosemberg D, Dias R, Bogo M, Bonan C. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. *Toxicology Letters*. 2007;174:25–30.

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(16):2071-82.

Rink E, Guo S. The too few mutant selectively affects subgroups of monoaminergic neurons in the zebrafish forebrain. *Neuroscience*. 2004;127(1):147-54.

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(3):230-40.

Rösner S, Hackl-Herrwerth A, Leucht S, Lehert P, Vecchi S, Soyka M. Acamprosate for alcohol dependence. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;(9).

Rushworth GF, Megson IL. Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol & Therapeut*. 2014;141(2):150-159.

Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2013;1830(8):4117-4129.

Santos BRD, Santos RCD, Dias CAGDM, Maximino C, Gouveia Jr A. White environment can be used as an aversive stimulus in zebrafish inhibitory avoidance learning. *Zebrafish*. 2019;16(5):443-450.

Santos LC, Ruiz-Oliveira J, Oliveira JJ, Silva PF, Luchiari AC. Irish coffee: Effects of alcohol and caffeine on object discrimination in zebrafish. *Pharmacol Biochem and Behav*. 2016;143:34-43.

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

Scaini G, Teodorak BP, Jeremias IC, Morais MO, Mina F, Dominguni D, Pescador B, Comim CM, Schuck PF, Ferreira GC, Quevedo J, Streck EL. Antioxidant administration prevents memory impairment in an animal model of maple syrup urine disease. *Behav Brain Res*. 2012;231(1):92-96.

Schilaty ND, Hedges DM, Jang EY, Folsom RJ, Yorgason JT, McIntosh JM, Steffensen SC. Acute ethanol inhibits dopamine release in the nucleus accumbens via $\alpha 6$ nicotinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;349(3):559-567.

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(2):203-7.

Shabani Z, Gharehziaaddin MJ. Effects and potential mechanisms of alcohol use disorder on the fate determination of newly born neurons in the Hippocampus. *Alcohol and Alcohol*. 2020;55(6):598-602.

Sheets L, Holmgren M, Kindt KS. How Zebrafish Can Drive the Future of Genetic-based Hearing and Balance Research. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2021;22(3):215-235.

Skinner MD, Lahmek P, Pham H, Aubin HJ. Disulfiram efficacy in the treatment of alcohol dependence: a meta-analysis. *PloS one*. 2014;9(2):e87366.

Slattery J, Kumar N, Delhey L, Berk M, Dean O, Spielholz C, Frye R. Clinical trials of N-acetylcysteine in psychiatry and neurology: a systematic review. *Neurosci & Biobehav Rev*. 2015;55:294-321.

Smaga I, Frankowska M, Filip M. N-acetylcysteine in substance use disorder: a lesson from preclinical and clinical research. *Pharmacol Rep*. 2021;73:1205-1219.

Tapiero H, Mathe G, Couvreur P, Tew KD. II. Glutamine and glutamate. *Biomed pharmacother*. 2002;56(9):446-457.

Toda T, Gage FH. Adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. *Cell tissue res*. 2018;373:693-709.

Topiwala A, Ebmeier KP. Effects of drinking on late-life brain and cognition. *BMJ Ment Health*. 2018;21(1):12-15.

Torres CA, Mendes NV, Baldin SL, Bernardo HT, Vieira KM, Scussel R, Silveira GB, Silveira PCL, Machado-de-Ávila RA, Rico EP. Cotreatment of small gold nanoparticles protects against the increase in cerebral acetylcholinesterase activity and oxidative stress induced by acute ethanol exposure in the zebrafish. *Neurosci*. 2021;457:41-50.

Vascotto SG, Beckham Y, Kelly GM. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochem Cell Biol*. 1997;75(5):479-85.

Vizuete AFK, Mussulini BH, Zenki KC, Baggio S, Pasqualotto A, Rosemberg DB, Bogo MR, de Oliveira DL, Rico, E. P. Prolonged ethanol exposure alters glutamate uptake leading to astrogliosis and neuroinflammation in adult zebrafish brain. *Neurotoxicology*. 2022;88:57-64.

Votaw VR, Witkiewitz K, Valeri L, Bogunovic, McHugh RK. Nonmedical prescription sedative/tranquilizer use in alcohol and opioid use disorders. *Addict Behav*. 2019; **88**:48–55.

Vuaden FC, Savio LEB, Rico EP, Mussulini BHM, Rosemberg DB, de Oliveira DL, Bogo MR, Bonan CD, Wyse ATS. Methionine Exposure Alters Glutamate Uptake and Adenine Nucleotide Hydrolysis in the Zebrafish Brain. *Mol Neurobiol*. 2016;53(1):200-209.

Walker LC, Berizzi AE, Chen NA, Rueda P, Perreau VM, Huckstep K, Srisontiyakul J, Govitrapong P, Xiaojian J, Lindsley CW, Jones CK, Riddy DM, Christopoulos A, Langmead CJ, Lawrence AJ. Acetylcholine muscarinic M4 receptors as a therapeutic

target for alcohol use disorder: converging evidence from humans and rodents. *Biol Psychiatry*. 2020;88(12):898-909.

Wei J, Dai Y, Wen W, Li J, Ye LL, Xu S, Duan DD. Blood-brain barrier integrity is the primary target of alcohol abuse. *Chem Biol Interact*. 2021;337:109400.

White AM, Matthews DB, Best PJ. Ethanol, memory, and hippocampal function: a review of recent findings. *Hippocampus*. 2000;10(1):88-93.

Witkiewitz K, Litten RZ, Leggio L. Advances in the science and treatment of alcohol use disorder. *Sci Adv*. 2019;5(9):eaax4043.

World Health Organization: Geneva. Global status report on alcohol and health; 2018. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241565639>.

World Health Organization: Global Information System on Alcohol and Health. Disponível em: Alcohol, heavy episodic drinking (15+), drinkers only, past 30 days (%) (who.int) Atualizado em: 23 de julho de 2020.

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(2):245-53.

Zenki KC, Mussulini BHM, Rico EP, de 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. *Toxicol in Vitro*. 2014;28(5):822-828.

Zhu S, Chen P, Chen M, Ruan J, Ren W, Zhang X, Gao Y, Li Y. Alcohol inhibits morphine/cocaine reward memory acquisition and reconsolidation in rats. *Psychopharmacol*. 2020;237:1043-1053.

Zimmermann H. ATP and acetylcholine, equal brethren. *Neurochem inter*. 2008;52(4-5):634-648.

ANEXO – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO CEUA



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 **31/05/2022**.

Título do projeto	Efeitos da N-acetilcisteína pós exposição repetida ao etanol na memória e na neurotransmissão em peixe-zebra
Project title	Effects of n-acetylcysteine post repeated ethanol exposure in zebrafish memory and neurotransmission
Número do protocolo Protocol number	39/2022
Pesquisador principal Principal Investigator	Eduardo Pacheco Rico
Pesquisadores Researchers	Ana Caroline Salvador de Farias, Daiana Alves Spilere, Eduardo Ronconi Dondossola, Henrique Teza Bernardo, Karolyne de Pieri Picler.
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	06/06/2022 a 06/06/2024
Espécie/linhagem/raça	Peixe** / Danio rerio
Idade/Peso	4meses / 0,400g
Número de animais	Masculino 139 + Feminino 139 = 278
Procedência	Biotério UNESC

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.


Josiane Budni
Coordenadora da CEUA

Criciúma-SC, 31 de maio de 2022