

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

MANOLO GUILHERME ROZO

**EFEITOS DO ÁCIDO QUINURÊNICO NOS PADRÕES
ANSIOGÊNICOS INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO
REPETITIVA AO ÁLCOOL NO PEIXE-ZEBRA**

CRICIÚMA, SETEMBRO DE 2024

MANOLO GUILHERME ROSO

**EFEITOS DO ÁCIDO QUINURÊNICO NOS PADRÕES
ANSIOGÊNICOS INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO
REPETITIVA AO ÁLCOOL NO PEIXE-ZEBRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Eduardo Pacheco Rico

CRICIÚMA, SETEMBRO DE 2024



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 451

Com início às 14 (quatorze) horas do dia 26 (vinte e seis) de setembro de 2024 (dois mil e vinte e quatro), realizou-se, na Sala 108/Bloco R1, o seminário formal de apresentação dos resultados da Dissertação de Mestrado de **MANOLO GUILHERME ROSO**, sob a orientação do **Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico**, intitulada “**EFEITOS DO ÁCIDO QUINURÊNICO NOS PADRÕES ANSIOGÊNICOS INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO REPETITIVA AO ÁLCOOL NO PEIXE-ZEBRA**”. A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Alexandra Ioppi Zugno (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, Profa. Dra. Fabricia Cardoso Petronilho (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado, e Profa. Dra. Nilda Vargas Barbosa (Universidade Federal de Santa Maria - UFSM) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: **APROVADO**, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Os trabalhos foram concluídos às 16h (dezesesseis) 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, 26 (vinte e seis) de setembro de 2024 (dois mil e vinte e quatro).

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

Samiris Albano Pereira
Secretária do PPGCS

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

R822e Roso, Manolo Guilherme.
Efeitos do ácido quinurênico nos padrões
ansio gênicos induzidos pela exposição repetitiva
ao álcool no peixe-zebra / Manolo Guilherme Roso.
- 2024.
41 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 - Tratamento. 2. Ácido
quinurênico - Uso terapêutico. 3. Ácido
quinurênico - Efeito fisiológico. 4.
Colinérgicos. 5. Ansiedade. 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.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade do Extremo Sul Catarinense, que contribuiu ativamente para a minha formação da pós graduação, possibilitando esse sonho. Agradeço a todos os professores, amigos e colegas que me inspiraram e acompanharam na minha jornada nesta instituição.

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 trajetória.

Ao Grupo de Pesquisa em Alcoolismo, por toda a ajuda, companheirismo e amizade, esse trabalho é também de vocês. Ao meu orientador, professor Dr. Eduardo Pacheco Rico, que esteve sempre presente para me guiar nesse caminho, que mesmo nos momentos mais difíceis esteve comigo, orientando, aconselhando, meu agradecimento, admiração por toda a dedicação, paciência e disponibilidade que disponibilizou para essa conquista.

Gostaria de agradecer em especial ao colega de pós-graduação, o Biólogo e também doutorando Josimar Grassi, por todas vezes que me ajudou nas bioquímicas, trocas de conhecimentos, mas principalmente pela amizade e parceria de sempre, obrigado amigo!

Agradeço a minha melhor amiga Tarcila, por todas as vezes que me apoiou, seja com palavras de apoio, carinho ou quando precisei de recursos financeiros, certamente eu não teria concluído esse trabalho, obrigado amiga, voce é a melhor.

Aos colegas de grupo, que o mestrado me trouxe, Guilherme, Eduardo, Henrique e Amanda, vocês fizeram essa jornada mais leve e divertida, e eu aprendi muito com vocês. A CAPES pelo apoio financeiro, tornando esta pesquisa possível de ser realizada. Aos meus familiares, que sempre incentivaram meus estudos e acreditaram em mim.

Aos colegas Taise e Jorge do laboratório da profa Samira Valvassori, que sempre que eu precisei, me ajudaram, tiraram duvidas e me orientaram em assuntos que eu desconhecia.

E por ultimo, a mim mesmo, por não desistir dos meus objetivos e sonhos.

RESUMO

O abuso de álcool é um grave problema de saúde pública e, apesar das opções terapêuticas disponíveis, há uma necessidade crescente de novas abordagens farmacológicas. O ácido quinurênico (KYNA) é uma molécula promissora, conhecida por antagonizar receptores glutamatérgicos e atuar como neuromodulador e neuroprotetor endógeno. Estudos indicam que o KYNA regula respostas afetivas e cognitivas, mostrando potencial ansiolítico, o que o torna relevante na psicofarmacologia. Nesse contexto, o peixe-zebra é um modelo experimental amplamente utilizado devido à sua sensibilidade ao etanol, especialmente em protocolos de exposição repetida ao etanol (ERE). Este modelo é valioso por mimetizar alvos moleculares humanos, facilitando a investigação de compostos que afetam comportamentos relacionados à privação de álcool. Neste estudo, peixes-zebra foram divididos em quatro grupos: G1 (Controle), G2 (Etanol, 1% por 20min/dia por 8 dias), G3 (KYNA, 20 μ M por 20 minutos no oitavo dia) e G4 (Etanol+KYNA). O comportamento foi avaliado pelo teste *novel tank*, e parâmetros como distância percorrida, velocidade média, tempo móvel, entradas, permanência nas diferentes regiões do tanque (topo, meio e fundo), além dos episódios, tempo e latência de freezing, foram analisados. Nos parâmetros bioquímicos, a captação de glutamato e a atividade da acetilcolinesterase (AChE) foram mensuradas. Os resultados demonstraram que o etanol reduziu significativamente a atividade da AChE nos peixes, com efeito parcialmente revertido pelo KYNA no grupo G4. Em relação à captação de glutamato, o etanol reduziu esse parâmetro, enquanto o KYNA não apresentou diferenças estatisticamente significativas em comparação ao controle. No comportamento exploratório, o etanol diminuiu a distância percorrida, sugerindo aumento da ansiedade, enquanto o KYNA não alterou esse parâmetro isoladamente, mas promoveu uma recuperação parcial da atividade locomotora quando administrado após a exposição ao etanol. No entanto, essa recuperação foi inferior ao controle. Os peixes expostos ao etanol também passaram mais tempo no fundo do tanque, evidenciando um comportamento ansioso, e o KYNA não conseguiu reverter completamente essas alterações. Além disso, o etanol aumentou os episódios, tempo e latência de freezing, sem melhora significativa com o tratamento com KYNA. Estes achados sugerem que, embora o KYNA tenha efeitos ansiolíticos e moduladores parciais, seus efeitos não foram suficientes para reverter todos os prejuízos causados pelo etanol no modelo de ERE em peixe-zebra, indicando que novos estudos são necessários para explorar seu potencial terapêutico.

Palavras-chave: alcoolismo, colinérgico, glutamato, ansiedade, KYNA, peixe-zebra

ABSTRACT

Alcohol abuse is a serious public health issue, and despite the available therapeutic options, there is an increasing need for new pharmacological approaches. Kynurenic acid (KYNA) is a promising molecule, known for antagonizing glutamatergic receptors and acting as an endogenous neuromodulator and neuroprotector. Studies suggest that KYNA regulates affective and cognitive responses, showing anxiolytic potential, which makes it relevant in psychopharmacology. In this context, zebrafish are a widely used experimental model due to their sensitivity to ethanol, especially in repeated ethanol exposure (REE) protocols. This model is valuable for mimicking human molecular targets, facilitating the investigation of compounds that affect behaviors related to alcohol deprivation. In this study, zebrafish were divided into four groups: G1 (Control), G2 (Ethanol, 1% for 1 hour/day for 8 days), G3 (KYNA, 20 μ M for 20 minutes in the 8th day), and G4 (Ethanol+KYNA). Behavior was assessed through the novel tank test, evaluating parameters such as distance traveled, average speed, mobile time, entries, and time spent in different tank regions (top, middle, and bottom), as well as freezing episodes, duration, and latency. Biochemical parameters included glutamate uptake and acetylcholinesterase (AChE) activity. The results showed that ethanol significantly reduced AChE activity in the fish, with a partial reversal observed in the G4 group (Ethanol+KYNA). Regarding glutamate uptake, ethanol decreased this parameter, while KYNA showed no statistically significant differences compared to the control. In terms of exploratory behavior, ethanol reduced the distance traveled, suggesting increased anxiety, whereas KYNA did not alter this parameter when administered alone but promoted a partial recovery of locomotor activity when administered after ethanol exposure. However, this recovery remained below control levels. Fish exposed to ethanol also spent more time at the bottom of the tank, indicating anxious behavior, and KYNA was unable to fully reverse these changes. Additionally, ethanol increased freezing episodes, duration, and latency, with no significant improvement following KYNA treatment. These findings suggest that although KYNA has partial anxiolytic and modulatory effects, its actions were insufficient to fully reverse the damage caused by ethanol in the REE zebrafish model, indicating that further studies are needed to explore its therapeutic potential.

Keywords: alcoholism, cholinergic, glutamate, anxiety, KYNA, zebrafish.

LISTA DE ABREVIATURAS

AChE: Acetilcolinesterase
ACSch: Acetilcolina
ADH: Álcool Desidrogenase
ALDH: Aldeído Desidrogenase
AMPA: Receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AVE: Acidente Vascular Encefálico
CEUA: Comitê de ética no uso de animais
CYP2E1: Citocromo P450 2E1
DSM-5 TR: Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais - Edição Revisada
DTNB: Ditiobisnitrobenzoato
EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetracético
EGTA: Ácido Etilenoglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético
ERE: Exposição Repetida ao Etanol
FDA: Food and Drug Administration
GABA: Ácido Gama-aminobutírico
HBSS: Hank's Balanced Salt Solution (Solução Salina Balanceada de Hank)
HEPES: Tampão HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetano-sulfônico)
KYNA: Ácido Quinurênico
NAC: Naltrexona
NMDA: Receptor N-metil-D-aspartato
SCh: Tiocolina
SNC: Sistema Nervoso Central
TUA: Transtorno por Uso de Álcool

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Efeito do ERE e tratamento com KYNA sobre a atividade da AChE em encéfalos de peixe-zebra.....16
- Figura 2:** Efeito do ERE e tratamento com KYNA sobre a captação do glutamato em encéfalos de peixe-zebra.....17
- Figura 3:** Parâmetros locomotores do peixe zebra no teste *novel tank*.....18
- Figura 4:** Efeito da ERE e tratamento com KYNA sobre o número de entradas, tempo e distância percorrida no fundo do tanque no teste *novel tank*.....20
- Figura 5:** Efeito da ERE e tratamento com KYNA sobre o número de entradas, tempo e distância percorrida no meio do tanque no teste *novel tank*.....21
- Figura 6:** Efeito da ERE e tratamento com KYNA sobre o número de entradas, tempo e distância percorrida no topo do tanque no teste *novel tank*.....23
- Figura 7:** Efeito da ERE e tratamento com KYNA sobre o número de episódios, tempo e latência de freezing apresentada pelos peixes-zebra no teste *novel tank*.....24

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O CONSUMO DO ALCOOL E RESPECTIVAS PROBLEMÁTICAS	1
1.2	ALCOOLISMO E TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS	3
1.3	O ÁCIDO QUINURÊNICO	4
1.4	PEIXE ZEBRA	6
1.5	JUSTIFICATIVA	7
2	OBJETIVOS	9
2.1	OBJETIVO GERAL	9
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3	MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1	ANIMAIS	10
3.2	EXPOSIÇÃO REPETIDA AO ETANOL E TRATAMENTO COM ÁCIDO QUINURÊNICO	10
3.3	PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS	11
3.3.1	Teste <i>Novel Tank</i>	11
3.4	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	12
3.4.1	Dosagem de proteínas	12
3.5	AVALIAÇÕES NEUROQUÍMICAS DO SISTEMA COLINÉRGICO	12
3.5.1	Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)	12
3.6	AVALIAÇÕES NEUROQUÍMICAS DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO	13
3.6.1	Ensaio do transporte de glutamato	13
3.6.1.1	Preparação do tecido	13
3.6.1.2	Ensaio de captação de glutamato	13
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	14
4	RESULTADOS	14
4.1	AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS	14
4.1.1	Sistema Colinérgico	15
4.1.2	Sistema Glutamatérgico	16
4.2	AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS	17
4.2.1	Avaliação do perfil locomotor de animais expostos ao etanol e tratados com KYNA no teste <i>novel tank</i>	17
4.2.2	Avaliação do perfil exploratório no fundo do tanque de animais expostos ao etanol e tratados com KYNA no teste <i>novel tank</i>	18
4.2.3	Avaliação do perfil exploratório no meio do tanque de animais expostos ao etanol e tratados com KYNA no teste <i>novel tank</i>	20
4.2.4	Avaliação do perfil exploratório no topo do tanque de animais expostos ao etanol e tratados com KYNA no teste <i>novel tank</i>	21
4.2.5	Avaliação do comportamento de freezing no tanque de animais expostos ao etanol e tratados com KYNA no teste <i>novel tank</i>	23
5	DISCUSSÃO	24
6	CONCLUSÃO	32
7	REFERÊNCIAS	33
	ANEXO I	41
	ANEXO II	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CONSUMO DO ALCOOL E RESPECTIVAS PROBLEMÁTICAS.

O alcoolismo é considerado uma questão de saúde pública, além de ser uma substância viciante com o potencial de desenvolvimento de uma dependência química, é comumente usado pelas pessoas por diferentes motivos e contextos (Ilhan e Yapar, 2020). O consumo irresponsável de álcool tem um impacto negativo não apenas nos usuários, mas também em suas famílias, amigos e na comunidade em que vivem. No geral, a principal forma de uso do álcool é para fins recreativos. (Ilhan e Yapar, 2020)

O consumo nocivo de álcool é um problema emergente de saúde e hoje tem se a informação que está associado a uma variedade de doenças e lesões, como por exemplo: câncer de boca, garganta, esôfago, fígado, cólon e mama (Smith-Warner et al., 1998), doenças cardiovasculares, como hipertensão arterial, doença cardíaca coronariana, acidente vascular encefálico (AVE), (Fuchs *et al*, 2001), distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo demência alcoólica, depressão, ansiedade e transtornos de uso de substâncias (Crews, 2018).

As políticas e medidas para prevenir o consumo de álcool não são implementadas de forma adequada e efetiva e o resultado disso é o aumento da quantidade de pessoas doentes. (Ilhan e Yapar, 2020) São diversos os desfechos do consumo problemático ou até mesmo patológico do álcool, porém dentro deles neste trabalho serão apresentados 3, que são: Álcool e Dependência química, Álcool e privação e Álcool e Ansiedade.

A dependência alcoólica tem sido apresentada como uma progressão do nível de ingestão controlada para o nível de consumo compulsivo, essa mudança acontece normalmente associada ao prazer e sendo dimensionada para um possível comportamento compulsório que visa a busca de determinada compensação. (Esel e Dinc, 2017). A origem sobre os Transtornos por uso do álcool (TUAs) geralmente são avaliadas se utilizando de uma estrutura biopsicossocial que por sua vez, apresenta uma visão mais ampla sobre os parâmetros de avaliação sobre os casos de alcoolistas, que enfatiza a interação da genética, da neurobiologia, da psicologia e do contexto social, e como todos esses fatores influenciam na construção da dependência alcoólica. (Mackillop et al., 2022) O TUA é definido pelo DSM5 TR (2023) como um conjunto de sintomas

comportamentais e físicos, como abstinência, tolerância e desejo.

O álcool é eliminado do corpo de diversas formas através de mecanismos metabólicos. As principais enzimas envolvidas são: o aldeído desidrogenase (ALDH), o álcool desidrogenase (ADH), citocromo P450 (CYP2E1) e a catalase. As pesquisas trouxeram que algumas variações nos genes de algumas dessas enzimas influenciam o consumo, o dano nos tecidos e a dependência do álcool. Algumas das consequências do metabolismo do álcool incluem a Hipóxia, dano tecidual; dano fetal; comprometimento de outros processos metabólicos; Câncer e alterações nas interações medicamentosas (Zakhari, 2006).

A privação ao álcool emite sinais que aparecem horas após a cessação da ingestão de álcool e estão associados a um estado de humor negativo, incluindo tensão e ansiedade. Estes efeitos sinérgicos negativos e positivos que são produzidos pelo efeito álcool dão origem à privação e à privação prolongada, que exerce um papel fundamental na evolução para a saída do alcoolismo (De Witte et al., 2003). Estudos mostraram que a retirada do álcool está associada ao aumento do glutamato no corpo estriado, no núcleo accumbens e no hipocampo (Rossetti e Carboni; 1995; Dahchour et al. 1996; e Dahchour et al., 1998). Esses efeitos geram impactos que alteram o funcionamento das funções dessas regiões neuroanatômicas. Como fator de resposta, a privação acaba levando a um estado que induz ao aumento de disforia, ansiedade, estado emocional negativo e estresse, em consequência a diminuição na liberação de dopamina no núcleo accumbens (Dahchour et al., 1996).

Um dado importante é que o abuso de álcool afeta significativamente o sistema colinérgico, reduzindo a atividade da colina acetiltransferase (ChAT) e da acetilcolinesterase (AChE), o que resulta em menor disponibilidade de acetilcolina no cérebro. Esse desequilíbrio contribui para disfunções cognitivas e comportamentais, agravadas pelo estresse oxidativo induzido pelo álcool. A exposição intermitente ao álcool altera a excitabilidade neural e pode levar a danos neuronais, destacando a importância de investigar essas interações para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Bernardo et al., 2019).

A ansiedade pode ser definida como um sistema complexo de respostas cognitivas, afetivas, fisiológicas e comportamentais. Isso ocorre quando o indivíduo se vê em situações ameaçadoras, ou seja, sintam que estão em perigo ou que algo está fora do seu controle, normalmente são imprevisíveis e incontroláveis e podem ser associadas

a diversas situações dependendo da experiência de quem a vive (Clark; Beck, 2012 e Muller et al., 2015). Os Transtornos de ansiedade e por uso de álcool são frequentemente associados em humanos. Isso é, se apresentam com uma relação bastante importante entre si, muitas vezes antecedem o abuso de álcool, e os altos níveis de ansiedade são um sintoma típico da dependência alcoólica que se manifesta durante a privação (Gilpin et al., 2017).

1.2 ALCOOLISMO E TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS

O dissulfiram foi o primeiro medicamento aprovado pela Foods and Drugs Administration (FDA) para tratamento do TUA em 1951, este fármaco é um inibidor do aldeído desidrogenase que age bloqueando a ação do metabolismo do álcool, fazendo com que aconteça um aumento na concentração de acetaldeído e tem sido utilizado por décadas como um fármaco antialcoólico (Vallari e Pietruszko, 1982 e Guo et al., 2022) Estudos de Fuller e Gordis (2004) sugerem que a administração supervisionada de dissulfiram se mostrou efetiva no tratamento de alcoolistas que lutam para ficar sóbrios.

Este medicamento apresenta desvantagens significativas, principalmente devido à sua baixa adesão ao tratamento, uma vez que muitos pacientes abandonam o uso devido aos efeitos colaterais severos, como náuseas, vômitos e dores de cabeça quando o álcool é ingerido. Outro fator limitante é sua eficácia dependente de supervisão rigorosa, pois o medicamento é mais eficiente quando tomado sob controle direto, o que reduz sua aplicabilidade em cenários sem monitoramento adequado (Plos One, 2014)

A naltrexona (NAC) é um medicamento que foi inicialmente aprovada para tratar o transtorno por uso de opioides e age como um antagonista do receptor opioide mu. Ao reduzir a atividade opioide que é induzida pelo álcool no sistema dopaminérgico mesolímbico, os antagonistas dos opioides como a naltrexona alteram e modulam os efeitos recompensadores do álcool, que como resposta reduzem o consumo. (Mitchel et al., 2012; Nestler, 2005).

A NAC apresenta como principais desvantagens no tratamento do alcoolismo sua eficácia moderada e os efeitos colaterais, como a hepatotoxicidade, que podem comprometer a adesão ao tratamento, especialmente em pacientes com problemas hepáticos (APA, 2018). A baixa adesão também é um desafio com a versão oral, devido à inconsistência na tomada da medicação (SAMHSA, 2015). A formulação injetável de liberação prolongada melhora a adesão, mas enfrenta obstáculos relacionados ao custo

e à disponibilidade (JAMA Network, 2024).

O acamprosato é outro fármaco utilizado no tratamento do TUA. Estudos clínicos randomizados descobriram que o tratamento reduziu o risco de pacientes abstinentes retornarem ao consumo de álcool, mas não teve o mesmo impacto em relação ao consumo excessivo de álcool. (Jonas et al., 2014) O tratamento com o acamprosato é recomendado para a obtenção e manutenção da privação completa, e não para a diminuição do consumo ou prevenção de recaídas em caso de consumo, em outras palavras ele é direcionado a quem já está em privação e gostaria de se manter sóbrio. (Rosner et al., 2010).

Por ser um medicamento utilizado para manutenção da abstinência em pacientes com dependência de álcool, ele enfrenta limitações importantes, como eficácia limitada, especialmente em pacientes sem comprometimento total com a abstinência, além de efeitos adversos, como diarreia, que afetam a adesão ao tratamento (Jonas et al., 2014; Spanagel et al., 2014). A neurotransmissão glutamatérgica desempenha um papel crucial na modulação de diversos processos neurofisiológicos, sendo particularmente relevante em modelos de exposição repetitiva ao álcool. Estudos recentes têm enfatizado a importância de investigar as interações entre o glutamato e o álcool, dado o impacto significativo do glutamato na plasticidade sináptica e nos comportamentos associados à dependência de substâncias (Moghaddam & Javitt, 2012).

As medicações utilizadas no tratamento do alcoolismo, como o dissulfiram, a naltrexona e o acamprosato, frequentemente causam efeitos colaterais que podem prejudicar a adesão dos pacientes ao tratamento. Entre esses efeitos estão náuseas, cefaleia e hepatotoxicidade, o que leva muitos pacientes a interromperem o uso, reduzindo a eficácia dessas abordagens terapêuticas (Krampe; Ehrenreich, 2020 ; Jonas et al., 2014). Nesse contexto, o ácido quinurênico surge como uma alternativa promissora. Ao atuar no sistema glutamatérgico, o KYNA apresenta propriedades neuroprotetoras, com menor risco de efeitos colaterais, o que pode aumentar a adesão ao tratamento e melhorar os resultados terapêuticos em pessoas com dependência do álcool (Vengeliene et al., 2016).

1.3 ÁCIDO QUINURÊNICO

O ácido quinurênico (KYNA) é um metabólito endógeno formado pela via da

quinurenina, derivada do metabolismo do triptofano, e é amplamente reconhecido por suas propriedades neuroprotetoras. (Cseh; Vecsei, 2021) Este composto desempenha um papel crucial na modulação da excitotoxicidade mediada pelo glutamato, um processo frequentemente associado a danos neuronais em condições patológicas, incluindo transtornos relacionados ao uso crônico de álcool. Pesquisas demonstram que o KYNA atua como um antagonista dos receptores NMDA, bloqueando a excitotoxicidade induzida por compostos como o ácido quinolínico, protegendo assim os neurônios contra danos e destacando seu potencial terapêutico em contextos de disfunções neuroquímicas (Stone & Connick, 1991). Além disso, tem demonstrado ser um recurso valioso para investigar parâmetros psicofarmacológicos e neuroquímicos, atuando como antagonista de vários outros receptores, tais como o cainato (Coleman et al., 1986), nicotínico (Hilmas et al., 2001, Wu et al., 2010) e receptores de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) (Prescott et al., 2006, Albuquerque et al., 2012). Além disso, este metabólito exerce atividade exógena e é um importante neuromodulador (Vezzani et al., 1991, Wu et al., 1994) e neuroprotetor (Leib et al., 1996; Amirkhani et al., 2002; Marosi et al., 2010).

Em estudos pré-clínicos e clínicos, os níveis endógenos de KYNA servem para sinalizar a presença de diversas disfunções cerebrais, servindo como um biomarcador, inclusive para o Alzheimer, além de regular as respostas afetivas e cognitivas. (Hartai et al., 2007; Robinson et al., 2013) Estudos anteriores sugerem a ação ansiolítica deste composto, e evidenciam que a administração central de KYNA em animais também pode causar respostas do tipo sedativas e antiestresse (Dennison et al., 1992; Yoshida et al., 2012) Estudos revelaram que o KYNA é, de fato, muito promissor, e que age também inibindo o receptor nicotínico $\alpha 7$ de forma não competitiva como um modulador alostérico negativo. (Hilmas et al., 2001; Lopes et al., 2007).

O peixe-zebra é conhecido por ser robusto e versátil, com suas propriedades neuroquímicas, flexibiliza e possibilita os estudos de neurociência e farmacologia. Sua utilização tem se consolidado devido à sua sensibilidade a alterações neuroquímicas e à presença de um sistema nervoso central (SNC) altamente organizado, que compartilha similaridades funcionais e estruturais com o SNC humano (Goldsmith, 2004; Kalueff et al., 2014).

Esta ferramenta experimental apresenta vantagens significativas, como seu rápido ciclo de vida, facilidade de manipulação genética e a transparência durante o

desenvolvimento embrionário, permitindo a observação direta e precisa dos efeitos farmacológicos e toxicológicos de diversas substâncias, estas características possibilitam que este animal seja um recurso importante para esta pesquisa (MacRae; Peterson, 2015).

A ansiedade associada ao abuso de álcool está ligada a uma desregulação das vias neurotransmissoras, particularmente aquelas mediadas pelos sistemas colinérgico e glutamatérgico, resultando em hiperexcitabilidade neuronal e comportamentos ansiosos (Koob, 2015). Nesse contexto, o ácido quinurênico (KYNA) surge como uma intervenção farmacológica promissora devido à sua ação como antagonista dos receptores NMDA e sua capacidade de modular o sistema glutamatérgico, atenuando a excitotoxicidade e, potencialmente, reduzindo os sintomas de ansiedade induzidos pelo álcool (Majláth et al., 2016).

O uso do peixe-zebra como ferramenta experimental oferece uma possibilidade única para investigar detalhadamente o papel do ácido quinurênico (KYNA) nas vias neuroquímicas desreguladas associadas à dependência de álcool. Estudos têm demonstrado que o peixe-zebra possui sistemas neurotransmissores que são análogos aos humanos, incluindo o sistema glutamatérgico, que é crucial para entender a excitotoxicidade induzida pelo álcool. Este modelo permite uma análise aprofundada dos efeitos terapêuticos do KYNA, especialmente em seu papel como antagonista dos receptores NMDA e na modulação do glutamato. Através dessas investigações, é possível desenvolver intervenções farmacológicas mais eficazes e específicas, contribuindo significativamente para o tratamento de transtornos de ansiedade relacionados ao uso crônico de álcool (Rico et al., 2011).

1.4 PEIXE ZEBRA

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um teleósteo de água doce da família *Cyprinidae*. Ele tem sido utilizado como modelo animal experimental em diferentes áreas de pesquisa, tais como: Biologia do desenvolvimento, comportamento, genética e genômica, teratologia e toxicologia (Vascotto et al., 1997; Horzmann e Freeman, 2018; Sheets et al., 2021). O peixe-zebra é um modelo fortemente consolidado para estudos de drogas e diversos fármacos, 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

Peterson, 2015).

Sabe-se que o peixe tem um SNC desenvolvido, com diversos sistemas de neurotransmissão identificados e descritos, tais como: dopaminérgico (Boehmler et al., 2004), GABAérgico (Kim et al., 2004), glutamatérgico (Edwards; Michel, 2002), serotoninérgico (Rink; Guo, 2004) e colinérgico (Behra et al., 2002). Em estudos com o álcool, o peixe-zebra é um modelo animal amplamente utilizado há mais de 20 anos, com protocolos comportamentais e doses de administração crônica e aguda estabelecidas (Gerlai et al., 2000; Gerlai et al., 2006). As diferentes condições de exposição alteram parâmetros glutamatérgicos, dopaminérgicos e colinérgicos (Agostini et al., 20+18; Bernardo et al., 2019; Alexandre et al., 2019). 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, contribuindo assim para a pesquisa (Kaluef et al., 2014; MacRae e Peterson, 2015; Muller et al., 2020). O peixe zebra é um animal ideal para pesquisas de laboratório, pois possui um baixo custo, requer pouca manutenção e pode produzir descendentes em grandes quantidades. (Gerlai et al., 2006)

1.5 JUSTIFICATIVA

O consumo excessivo de álcool foi identificado como um grave problema de saúde pública, com implicações neuropsiquiátricas como ansiedade, depressão e prejuízos cognitivos, decorrentes de sua ação neurotóxica no sistema nervoso central. Embora os efeitos do álcool no cérebro sejam amplamente conhecidos, ainda há uma lacuna na compreensão dos mecanismos envolvidos e nas opções terapêuticas eficazes. Nesse contexto, o ácido quinurênico (KYNA) destacou-se como uma molécula promissora, conhecida por suas propriedades neuroprotetoras e moduladoras, o que a tornou relevante em pesquisas recentes sobre a regulação da neurotransmissão. O KYNA, um metabólito da via da quinurenina, atua como antagonista dos receptores NMDA e modulador dos receptores nicotínicos de acetilcolina, regulando a neurotransmissão glutamatérgica. Esses sistemas são significativamente afetados pelo álcool, tornando a investigação dos efeitos do KYNA essencial. Embora os impactos do álcool em modelos animais como o peixe-zebra já sejam bem estabelecidos, a novidade deste estudo está na exploração da capacidade do KYNA de mitigar os danos causados pelo álcool no sistema nervoso central. O peixe-zebra, bastante utilizado em estudos devido à sua homologia genética com humanos e facilidade de manipulação, permanece um modelo

translacional eficaz. Este estudo investigou a capacidade do KYNA de atenuar os efeitos neurotóxicos do álcool no peixe-zebra, focando em parâmetros bioquímicos e comportamentais relacionados à ansiedade e neurotransmissão. Foram avaliadas as influências do KYNA sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE), a captação do glutamato e as alterações comportamentais induzidas pela exposição repetida ao álcool. Essas análises foram cruciais para entender como o KYNA poderia modular sistemas essenciais para a homeostase neuronal, como o sistema glutamatérgico e colinérgico. Ao demonstrar os efeitos ansiolíticos e neuroprotetores do KYNA em um modelo estabelecido de exposição ao álcool, este estudo contribuiu para o entendimento dos mecanismos de dano do álcool e abriu novas perspectivas terapêuticas. A aplicação do KYNA representa uma abordagem inovadora para o tratamento de transtornos associados ao consumo de álcool, oferecendo potencial para menos efeitos colaterais em comparação com os tratamentos convencionais. Assim, os achados deste estudo proporcionam avanços para o desenvolvimento de novas substâncias farmacológicas, com foco em intervenções mais eficazes para distúrbios de ansiedade e dependência alcoólica, além de abrir novas frentes de pesquisa na neurociência translacional.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do KYNA em peixes-zebra expostos repetidamente ao etanol

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os parâmetros neuroquímicos que estão associados a sinalização colinérgica e glutamatérgica no tecido de cérebros de peixes-zebra expostos ao álcool e ao ácido quinurênico;
- Avaliar o efeito do protocolo da ERE em animais tratados com KYNA sobre os parâmetros comportamentais utilizando o teste *Novel Tank*.
- Avaliar se houve alteração nos padrões ansiogênicos de animais expostos ao álcool e tratados com o KYNA.

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 foi aprovado sob protocolo número 63/2023.

Os peixes-zebras (*Danio rerio*) foram obtidos do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O ambiente de moradia foi uma sala adequada e exclusiva para os peixes, onde foram mantidos 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 2 peixes por litro de água e a alimentação realizada duas vezes ao dia com ração flocada Alcon® e *Artêmia salina*, alternadamente.

Foram utilizados 228 animais, distribuídos em 4 grupos apresentados na tabela a seguir:

Nome do grupo	Quantidade de animais	Tipo de tratamento	TOTAL
Grupo 1 – Controle	57 animais	Apenas o estresse da troca de aquário.	
Grupo 2 – ERE	57 animais	Protocolo ERE	
Grupo 3 – KYNA	57 animais	Estresse da troca de aquário + exposição ao KYNA	
Grupo 4 – ERE + KYNA	57 animais	Protocolo ERE e tratamento com o KYNA.	
			228 animais

Após os experimentos os animais foram eutanasiados utilizando o protocolo de imersão em triclaína 160mg/L por 30 segundos seguido de decapitação com bisturi para a retirada dos encéfalos.

3.2 EXPOSIÇÃO REPETIDA AO ETANOL E TRATAMENTO COM ÁCIDO QUINURÊNICO

Durante a exposição ao etanol, os peixes dos grupos correspondentes foram transferidos de seus aquários habituais para um aquário contendo 1% de álcool diluído em água, onde permaneceram por 20 minutos. Após esse período, os peixes foram transferidos de volta para seus aquários habituais. Esse procedimento, conhecido como

exposição repetida ao etanol (ERE), foi realizado durante 8 dias consecutivos para os grupos G2 e G4. Para controlar possíveis estresses de manipulação, os peixes dos grupos controle (G1) e (G3) foram transferidos com a mesma frequência e duração para um aquário diferente, contendo apenas água salinizada habitual. No grupo G3, após o término do experimento no 8º dia, os peixes foram expostos ao ácido quinurênico (KYNA) por 20 minutos, uma única vez. No grupo G4, os peixes foram submetidos ao protocolo ERE e, após o 8º dia, foram tratados com KYNA. A dosagem de KYNA utilizada foi de 20mg por litro, conforme testado por Kalueff e colaboradores em um estudo sobre exposição aguda ao KYNA (Robinson et al., 2011).

3.3 PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

3.3.1 *Novel Tank*

O teste *novel tank* é um método comportamental utilizado para avaliar a ansiedade em peixes-zebra. Este teste se baseia na observação do comportamento de natação dos peixes quando introduzidos em um novo ambiente, onde a tendência dos peixes ansiosos é permanecer na metade inferior do tanque, enquanto peixes menos ansiosos exploram mais a metade superior. De acordo com Rosemberg et al. (2011), o tempo gasto na metade inferior do tanque e a latência para entrar na metade superior são indicadores robustos de comportamento ansiogênico.

A análise comportamental foi realizada com o software ANY-maze® para rastrear a atividade da natação dos peixes-zebra, medindo a distância percorrida, velocidade média, tempo de mobilidade, tempo móvel, entradas, tempo e distancia no topo, meio e fundo e episódios, tempo e latencia de freezing. A atividade exploratória vertical e horizontal foi avaliada por meio de medidas de tempo gasto, número de transições e distâncias percorridas em cada área. A razão entre o número de transições por seção e área ajudou a estimar o perfil ansiogenico. A distribuição dos animais foi avaliada por comparações entre grupos.

3.4 PARÂMETROS BIOQUIMICOS

3.4.1 **Dosagem de proteínas**

O método de dosagem utilizado foi adaptado de Lowry e colaboradores (1951). O primeiro passo foi realizar 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 μ L) de solução padrão de albumina, junto a 1000 μ L Reativo C por microtubo. O Reativo C foi preparado no dia da dosagem, contendo uma parte do Reativo B1 e uma parte do 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, foi então, utilizado o sedimento para a dosagem de proteínas, que foram pipetados em microtubos duplicados, onde adiciona-se 190 μ L de água milli-Q, 10 μ L do homogeneizado e 1000 μ L de Reativo C, nesta ordem. Posterior aos procedimentos descritos, Foi agitado cada microtubo em um vórtex e aguardado 10 minutos, então, adicionado 100 μ L de reagente Folin 1N em todos os tubos e agitado novamente, em seguida foi aguardado 20 minutos em ambiente escuro. O último passo foi transferir a curva de calibração e as amostras para uma microplaca de 96 poços, na quantidade de 280 μ L por poço e em duplicata. A leitura foi feita em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 650nm no modo *endpoint*.

3.5 AVALIAÇÕES NEUROQUÍMICAS DO SISTEMA COLINÉRGICO

3.5.1 Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)

A 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 ditioisnetrobenzoato, 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. Esses encéfalos foram homogeneizados em um tampão de homogeneização de tris-citrato 250mM com EDTA 2mM e EGTA 2mM. Em seguida, foram centrifugados a 1000rcf por 10 minutos a 4°C. Após a retirada do sobrenadante, utilizou-se o sedimento para a dosagem de proteína, descrita no item 3.4.1.

Após os procedimentos descritos, em uma microplaca de 96 poços foi adicionado água 150 μ L no branco e 145 μ L nos poços que receberam as amostras. Posterior a esta etapa, adicionou-se 75 μ L de dianion-tiolato (DTNB), preparado no dia com tampão fosfato de potássio 150mM e bicarbonato de sódio, protegido da luz. A última substância que foi adicionada antes da reação foi 5 μ L do sedimento do homogeneizado das amostras. (Rico et al, 2007)

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, adiciona-

se nos poços 25 μ L de acetilcolina (ACSh, 0,8 mM) para realizar a leitura em espectrofotômetro no método cinético, onde a hidrólise do substrato será monitorada pela formação de DTNB a 412 nm por 2-3 minutos (intervalos de 30 s). Os controles sem a preparação de homogeneizado foram realizados para determinar a hidrólise não enzimática de ACSh. 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.

3.6 AVALIAÇÕES NEUROQUÍMICAS SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

3.6.1 Ensaio do transporte de glutamato

3.6.1.1 Preparação do tecido

Os animais foram anestesiados e posteriormente eutanasiados antes da dissecação do cérebro. Os cérebros foram colocados em placas de Petri com 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. Cada cérebro foi então separado e transferido para placas de cultura de 24 poços, contendo 0,5mL de tampão HBSS- HEPES. Apenas um cérebro total foi transferido para cada poço e todas as placas serão mantidas a 37°C ao longo dos experimentos. (Gupta; Mullins, 2010)

3.6.1.2 Ensaio de captação de glutamato

O ensaio de captação de glutamato foi realizado conforme descrito por Rico et al. (2010). Para avaliar o transporte de glutamato, a captação total foi medida pela adição de 0,33 μ Ci/mL de L-[³H] glutamato ao meio de incubação, mantido a 37°C. A captação foi interrompida após um período de 7 minutos, seguido por duas lavagens subsequentes com tampão HBSS-HEPES gelado.

A captação de glutamato independente de Na⁺ foi avaliada nas mesmas condições descritas anteriormente, substituindo o sódio por N-metil-D-glucamina no meio de incubação. A captação de glutamato dependente de Na⁺ será determinada pela diferença entre a radioatividade incorporada na captação total e na captação independente de Na⁺. Após os procedimentos de incubação, o tecido cerebral foi homogeneizado. O conteúdo proteico foi quantificado utilizando alíquotas de 10 μ L do homogeneizado, e a radioatividade foi medida por meio de cintilação líquida. (Rico et al, 2010).

3.7 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 for maior que 0,05 será aceita a hipótese de nulidade (H_0), e as amostras serão paramétricas com resultados expressos por média e desvio padrão. Se o teste de normalidade rejeitar H_0 , os dados serão não paramétricos e expressos por mediana e intervalo interquartil. O software utilizado para compilar a análise estatística será o GraphPad Prism 8. Os experimentos comportamentais foram submetidos a testes pareados, e os dados experimentais bioquímicos foram submetidos a testes não pareados. O valor de significância para todos os experimentos será de $p = 0,05$.

4 RESULTADOS

Este capítulo apresenta uma análise detalhada dos resultados obtidos nos experimentos conduzidos para avaliar os efeitos do KYNA e do ERE sobre os parâmetros comportamentais e bioquímicos no peixe-zebra. O objetivo central dos estudos foi investigar como o KYNA, conhecido por suas propriedades neuroprotetoras e moduladoras do sistema glutamatérgico, influencia os comportamentos associados à ansiedade induzida pelo álcool, bem como os mecanismos bioquímicos envolvidos.

Nos testes comportamentais, foram avaliados a distância percorrida, velocidade média, tempo móvel e cruzamentos de linha, também foi avaliado o número de entradas, o tempo e a distância percorrida na seção topo, meio e fundo do tanque, que são indicativos da atividade exploratória e da ansiedade em peixes-zebra. Adicionalmente, foi avaliado o comportamento de freezing, sobre os seguintes parâmetros: os episódios, tempo e latência e foi medido como um indicador direto de respostas de ansiedade, considerando o impacto tanto do álcool quanto do KYNA na modulação desses comportamentos.

Nas avaliações bioquímicas, a pesquisa concentrou-se na captação de glutamato e na atividade enzimática colinérgica, a AChE. A captação de glutamato foi investigada para avaliar possíveis alterações na neurotransmissão excitatória, enquanto a AChE foi medida para entender a modulação das funções cognitivas e motoras.

4.1 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

4.1.1 Sistema Colinérgico

Com o objetivo de entender o impacto do etanol e do ácido quinurênico (KYNA) na atividade da acetilcolinesterase (AChE), foi realizada uma avaliação comparativa entre os diferentes grupos experimentais (Figura 1). A atividade da AChE, medida em $\mu\text{mol ACSCh/mg}$ de proteína, mostrou uma redução significativa no grupo etanol em comparação ao grupo controle. O grupo controle apresentou uma média de 2,236 $\mu\text{mol ACSCh/mg}$ de proteína, enquanto o grupo etanol apresentou uma redução significativa para 1,346 $\mu\text{mol ACSCh/mg}$ de proteína (ANOVA, $F_{3,19} = 2,489$, $p = 0,0914$; Tukey, $p = 0,0376$).

O tratamento isolado com KYNA resultou em uma atividade da AChE de 1,756 $\mu\text{mol ACSCh/mg}$ de proteína, sem diferença significativa em relação ao controle (ANOVA, $p > 0,05$), sugerindo que o KYNA, por si só, não exerce um efeito inibitório substancial sobre a atividade da AChE.

No grupo tratado com etanol e KYNA (Etanol+KYNA), a atividade da AChE foi parcialmente restaurada, alcançando uma média de 1,98 $\mu\text{mol ACSCh/mg}$ de proteína. No entanto, essa recuperação não atingiu significância estatística quando comparada ao grupo etanol (ANOVA, $F_{3,19} = 2,489$, $p > 0,05$).

Esses resultados sugerem que o etanol exerce um efeito inibitório significativo sobre a atividade da AChE, enquanto o tratamento com KYNA pode ter um efeito modulador, atenuando parcialmente o impacto do etanol sobre essa enzima, mas sem alcançar significância estatística em todos os casos.

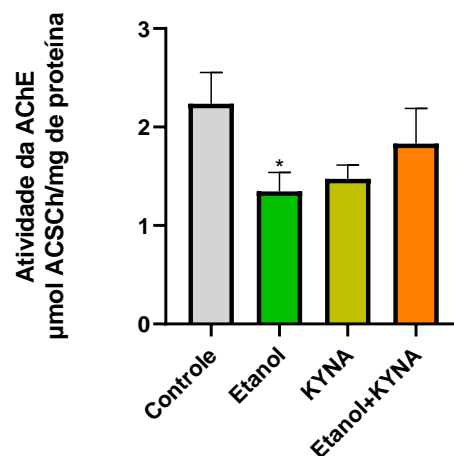


Figura 1. Efeito do ERE e tratamento com KYNA sobre a atividade da AChE em encéfalos de peixe zebra. Os valores das atividades enzimáticas estão expressos em média e erro padrão da média, e em $\mu\text{mol ACSCh/h/mg}$ de proteína. * $p < 0,05$ em múltiplas comparações (ANOVA de uma via seguido do teste Dunn).

4.1.2 Sistema Glutamatérgico

Com o objetivo de compreender o envolvimento do sistema glutamatérgico na modulação pelo etanol e ácido quinurênico (KYNA), avaliamos a captação de glutamato no cérebro de peixe-zebra (Figura 2). O grupo exposto ao etanol apresentou uma redução significativa na captação de glutamato, com uma média de 0,0393 nmol/minuto/mg de proteína, em comparação ao grupo controle, que apresentou 0,0645 nmol/minuto/mg de proteína (ANOVA, $F_{3,36} = 3.27$, $p = 0,043$; Tukey, $p = 0,042$).

Por outro lado, o tratamento com KYNA de forma isolada não resultou em uma alteração significativa na captação de glutamato, com uma média de 0,0530 nmol/minuto/mg de proteína, semelhante ao grupo controle. O grupo tratado com etanol e KYNA (G4) apresentou uma leve recuperação na captação de glutamato, alcançando uma média de 0,0560 nmol/minuto/mg de proteína, embora essa diferença não tenha atingido significância estatística quando comparada ao grupo etanol (ANOVA, $F_{3,36} = 2.89$, $p = 0,067$).

Esses resultados indicam que o etanol pode exercer um efeito inibitório sobre a captação de glutamato, enquanto o KYNA, isoladamente ou em combinação com o etanol, pode ter um efeito modulador, mas sem alcançar significância estatística.

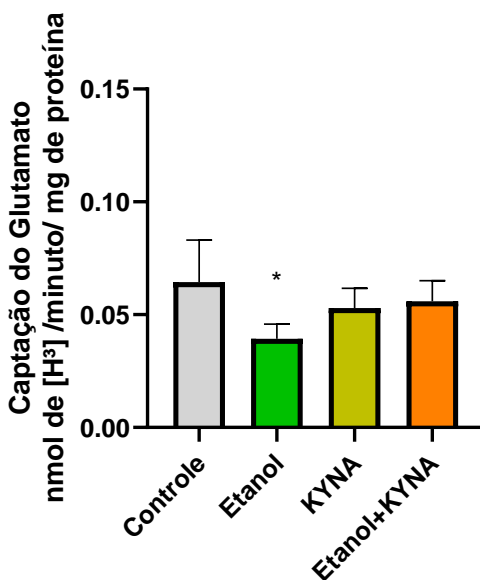


Figura 2: **Efeito da ERE e tratamento com KYNA sobre a captação de glutamato em encéfalos de peixe-zebra.** Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. O valor do glutamato captado está expresso em nmol de glutamato marcado por minuto por miligrama de proteína. * $p < 0,05$ em múltiplas comparações (teste ANOVA de uma via seguido do teste de Dunn).

4.2 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS

4.2.1 Avaliação do perfil locomotor dos animais expostos ao etanol e tratados com KYNA no teste *novel tank*

Para avaliar o perfil locomotor após a exposição ao etanol e o tratamento com ácido quinurênico (KYNA), foram analisados a distância de nado, velocidade média, tempo móvel e cruzamentos de linha (*line crossings*) no teste de Novel Tank (Figura 3). O KYNA, quando administrado de forma isolada, não alterou significativamente a distância ou a velocidade média em relação ao grupo controle.

No entanto, a exposição ao etanol demonstrou um efeito importante, com o grupo Etanol (G2) apresentando uma redução significativa na distância (gráfico A) (média de 7.171 m) e na velocidade média (gráfico B) (0,020 m/s), comparado ao grupo controle (média de 10.855 m e 0,030 m/s, respectivamente), com um valor de $p = 0,0335$ para distância e $p = 0,0338$ para velocidade (Kruskal-Wallis). Embora o grupo Etanol+KYNA (gráfico A e B) tenha mostrado uma tendência de recuperação parcial nesses parâmetros, não foi observada significância estatística nessa recuperação.

Em relação ao tempo móvel (gráfico C), todos os grupos apresentaram mobilidade semelhante, sem aumento ou diminuição significativa ($p = 0,0308$). Ao analisar o número de cruzamentos de linha (gráfico D), os grupos tratados com KYNA de forma isolada não apresentaram diferença significativa. No entanto, os grupos expostos ao etanol e tratados com KYNA apresentaram uma redução significativa no número de cruzamentos de linha ($p = 0,0072$), confirmando o efeito ansiolítico do KYNA no comportamento exploratório dos animais.

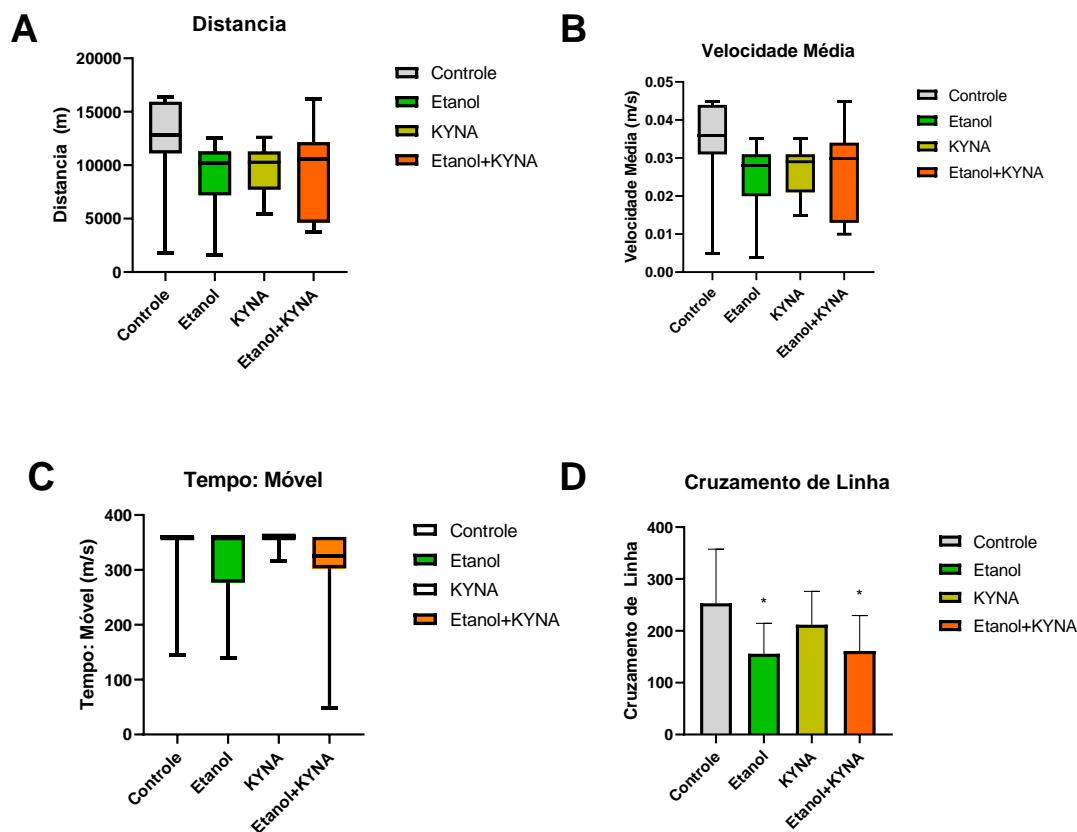


Figura 3 – **Parâmetros locomotores do peixe-zebra no teste *Novel tank***. Efeito do tratamento com ácido quinurênico (KYNA) isolado e combinado à exposição repetida ao etanol (ERE) sobre os parâmetros locomotores distância (A), velocidade média (B), tempo móvel (C) e cruzamento de linhas (D). Nos gráficos (A), (B) e (C) os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de múltiplas comparações de Dunn e estão expressos em mediana e intervalo interquartil. No gráfico (D) os dados foram analisados pelo teste ANOVA de uma via seguido pelo teste de múltiplas comparações de Tukey e estão expressos em média e desvio padrão. (* $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle; * $p < 0,05$ em comparação ao grupo ERE não tratado).

4.2.2 Avaliação do perfil exploratório no fundo do tanque dos animais expostos ao etanol e tratados com KYNA no teste *novel tank*

Como forma de verificar o perfil exploratório no fundo do tanque pela exposição ao etanol, bem como pelo tratamento com ácido quinurênico (KYNA), foram avaliados inicialmente o número de entradas, o tempo de permanência e a distância percorrida no fundo no teste *novel tank* (Figura 4). O grupo controle apresentou uma média de 28 entradas no fundo do tanque. O grupo exposto ao etanol mostrou uma redução significativa nesse parâmetro, com uma média de 11 entradas (Kruskal-Wallis, $p = 0,004$; Dunn, $p = 0,029$), sugerindo que o etanol pode exercer um efeito ansiolítico ao reduzir a exploração dessa região. O tratamento isolado com KYNA não alterou significativamente o número de entradas comparado ao grupo controle, com uma média de 22 entradas. No entanto, o

grupo Etanol+KYNA apresentou uma diminuição adicional no número de entradas, com uma média de 9 entradas (Kruskal-Wallis, $p = 0,002$; Dunn, $p = 0,017$), sugerindo que o KYNA pode modular, mas não reverter completamente, o efeito do etanol.

No que diz respeito ao tempo de permanência no fundo do tanque, o grupo controle apresentou um tempo médio de 250 segundos. Já o grupo etanol teve um aumento significativo nesse tempo, alcançando 327 segundos (Kruskal-Wallis, $p = 0,003$; Dunn, $p = 0,034$), o que reforça o efeito ansiolítico do etanol. O KYNA, quando administrado de forma isolada, reduziu o tempo de permanência no fundo para 194 segundos. Contudo, o grupo Etanol+KYNA demonstrou um tempo de permanência aumentado para 339 segundos (Kruskal-Wallis, $p = 0,001$; Dunn, $p = 0,021$), sugerindo uma possível interação entre o KYNA e o etanol que promove um efeito combinado sobre esse comportamento.

Ao avaliar a distância percorrida no fundo do tanque, o grupo controle e o grupo etanol mostraram valores semelhantes, com 7698 metros e 7747 metros, respectivamente, indicando que o etanol não teve um impacto significativo nesse parâmetro. No entanto, o grupo tratado apenas com KYNA apresentou uma redução considerável na distância percorrida, com 4601 metros (ANOVA, $p = 0,005$; teste de Tukey, $p = 0,042$). Interessantemente, o grupo Etanol+KYNA apresentou um aumento na distância percorrida, atingindo 8324 metros, sugerindo que o tratamento combinado pode ter um efeito modulador na atividade locomotora dos peixes (ANOVA, $p = 0,002$; teste de Tukey, $p = 0,031$).

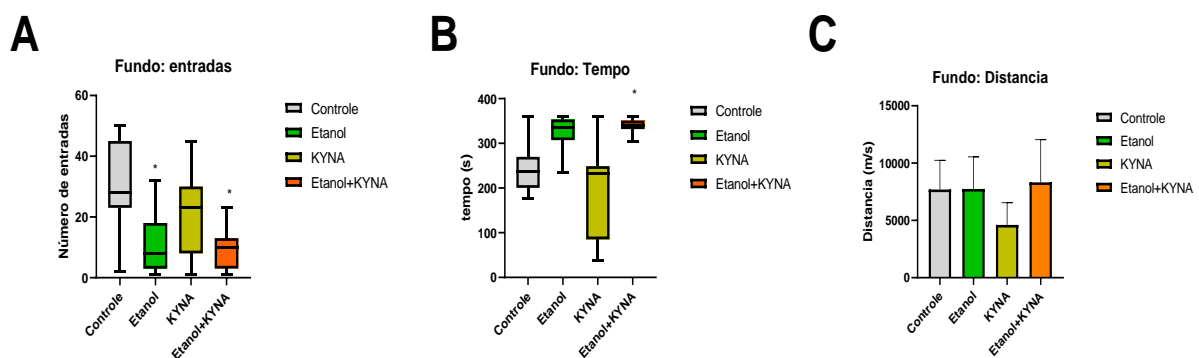


Figura 4: **A: Efeito da ERE e tratamento com KYNA sobre o número de entradas dos peixes-zebra na região do fundo do tanque no teste *novel tank*.** Os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartil. O número de entradas está representado no eixo Y. * $p < 0,05$ em múltiplas comparações (Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn). **B: Efeito da ERE e tratamento com KYNA sobre o tempo de permanência dos peixes-zebra no fundo do tanque durante o teste *novel tank*.** Os resultados são expressos em mediana e intervalo interquartil. O tempo de permanência está representado no eixo Y em segundos (s). * $p < 0,05$ em múltiplas comparações (Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn). **C: Efeito do ERE tratamento com KYNA sobre a distância percorrida pelos peixes-zebra na região do fundo do tanque durante o teste *novel tank*.** Os resultados são expressos como média e erro padrão da média

(EPM). A distância percorrida está representada no eixo Y em metros por segundo (m/s). $p < 0,05$ em múltiplas comparações (ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey).

4.2.3 Avaliação do perfil exploratório no meio do tanque dos animais expostos ao etanol e tratados com KYNA no teste *novel tank*

Como forma de verificar o perfil exploratório no meio pela exposição ao etanol, bem como pelo tratamento com ácido quinurênico (KYNA), foram avaliados inicialmente o número de entradas, o tempo de permanência e a distância percorrida no meio no teste *novel tank* (Figura 5). O grupo controle apresentou uma média de 41 entradas no meio do tanque. O grupo etanol mostrou uma redução significativa nesse parâmetro, com uma média de 13 entradas (Kruskal-Wallis, $p=0,003$; Dunn, $p=0,026$), sugerindo que o etanol pode exercer um efeito ansiolítico ao reduzir a exploração dessa região. Por outro lado, o tratamento isolado com KYNA não alterou significativamente o número de entradas comparado ao grupo controle, com uma média de 32 entradas. No entanto, o grupo etanol tratado com KYNA apresentou uma diminuição adicional no número de entradas, com uma média de 10 entradas (Kruskal-Wallis, $p=0,002$; Dunn, $p=0,018$), sugerindo que o KYNA pode modular, mas não reverter completamente, o efeito do etanol.

No que diz respeito ao tempo de permanência no meio do tanque, o grupo controle apresentou um tempo médio de 74 segundos. Já o grupo etanol teve uma redução significativa nesse tempo, alcançando 25 segundos (Kruskal-Wallis, $p=0,004$; Dunn, $p=0,033$), o que reforça o efeito ansiolítico do etanol. O tratamento com KYNA, quando administrado de forma isolada, resultou em um aumento do tempo de permanência no meio para 85 segundos. Contudo, o grupo Etanol+KYNA demonstrou uma diminuição significativa no tempo de permanência para 15 segundos (Kruskal-Wallis, $p=0,001$; Dunn, $p=0,019$), sugerindo uma interação complexa entre o KYNA e o etanol, com potencial efeito modulador.

Por fim, ao avaliar a distância percorrida no meio do tanque, o grupo controle percorreu uma média de 3,3 metros, enquanto o grupo etanol apresentou uma redução significativa para 0,9 metros (Kruskal-Wallis, $p=0,005$; Dunn, $p=0,040$). O grupo tratado apenas com KYNA apresentou uma distância percorrida de 2,6 metros. Interessantemente, o grupo Etanol+KYNA apresentou a menor distância percorrida, com uma média de 0,7 metros (Kruskal-Wallis, $p=0,003$; Dunn, $p=0,028$), indicando que a combinação de etanol e KYNA pode ter um impacto mais acentuado na redução da atividade locomotora dos peixes.

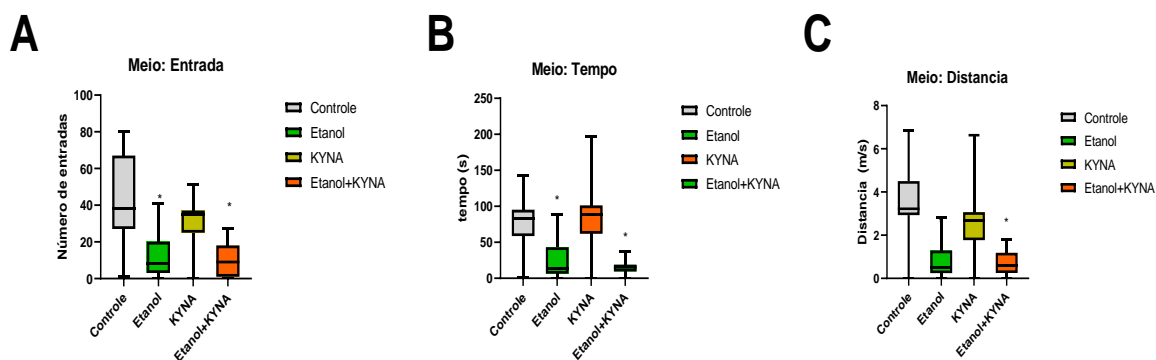


Figura 5: **A: Efeito da ERE e tratamento com KYNA sobre o número de entradas dos peixes-zebra na região do meio do tanque no teste *novel tank*.** Os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartil. O número de entradas está representado no eixo Y. * $p < 0,05$ em múltiplas comparações (Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn). **B: Efeito da ERE e tratamento com KYNA sobre o tempo de permanência dos peixes-zebra no meio do tanque durante o teste *novel tank*.** Os resultados são expressos em mediana e intervalo interquartil. O tempo de permanência está representado no eixo Y em segundos (s). * $p < 0,05$ em múltiplas comparações (Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). **C: Efeito do ERE tratamento com KYNA sobre a distância percorrida pelos peixes-zebra na região do meio do tanque durante o teste *novel tank*.** Os resultados são expressos como mediana e intervalo interquartil. A distância percorrida está representada no eixo Y em metros por segundo (m/s). Em múltiplas comparações (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

4.2.4 Avaliação do perfil exploratório no topo do tanque dos dos animais expostos ao etanol e tratados com KYNA no teste *novel tank*

Como forma de verificar o perfil exploratório no topo do tanque pela exposição ao etanol, bem como pelo tratamento com ácido quinurênico (KYNA), foram avaliados inicialmente o número de entradas, o tempo de permanência e a distância percorrida no topo no teste *novel tank* (Figura 6). O grupo controle apresentou uma média de 16 entradas no topo do tanque. O grupo etanol mostrou uma redução significativa nesse parâmetro, com uma média de 3 entradas (Kruskal-Wallis, $p=0,002$; Dunn, $p=0,025$), sugerindo que o etanol pode exercer um efeito ansiolítico ao reduzir a exploração dessa região. Por outro lado, o tratamento isolado com KYNA não alterou significativamente o número de entradas comparado ao grupo controle, com uma média de 13 entradas. No entanto, o grupo etanol tratado com KYNA apresentou uma diminuição adicional no número de entradas, com uma média de 4 entradas (Kruskal-Wallis, $p=0,003$; Dunn, $p=0,022$), sugerindo que o KYNA pode modular, mas não reverter completamente, o efeito do etanol.

No que diz respeito ao tempo de permanência no topo do tanque, o grupo controle apresentou um tempo médio de 35 segundos. Já o grupo etanol teve uma redução significativa nesse tempo, alcançando 7 segundos (Kruskal-Wallis, $p=0,004$; Dunn, $p=0,031$), o que reforça o efeito ansiolítico do etanol. O tratamento com KYNA, quando

administrado de forma isolada, resultou em um aumento do tempo de permanência no topo para 80 segundos. Contudo, o grupo Etanol+KYNA demonstrou uma diminuição significativa no tempo de permanência para 6 segundos (Kruskal-Wallis, $p=0,001$; Dunn, $p=0,019$), sugerindo uma interação complexa entre o KYNA e o etanol, com potencial efeito modulador.

Por fim, ao avaliar a distância percorrida no topo do tanque, o grupo controle percorreu uma média de 1,6 metros, enquanto o grupo Etanol apresentou uma redução significativa para 0,3 metros (Kruskal-Wallis, $p=0,005$; Dunn, $p=0,040$). O grupo tratado apenas com KYNA apresentou uma distância percorrida de 2,3 metros. Interessantemente, o grupo Etanol+KYNA apresentou uma distância percorrida de 0,4 metros (Kruskal-Wallis, $p=0,004$; Dunn, $p=0,030$), indicando que a combinação de etanol e KYNA pode ter um impacto mais acentuado na redução da atividade locomotora dos peixes.

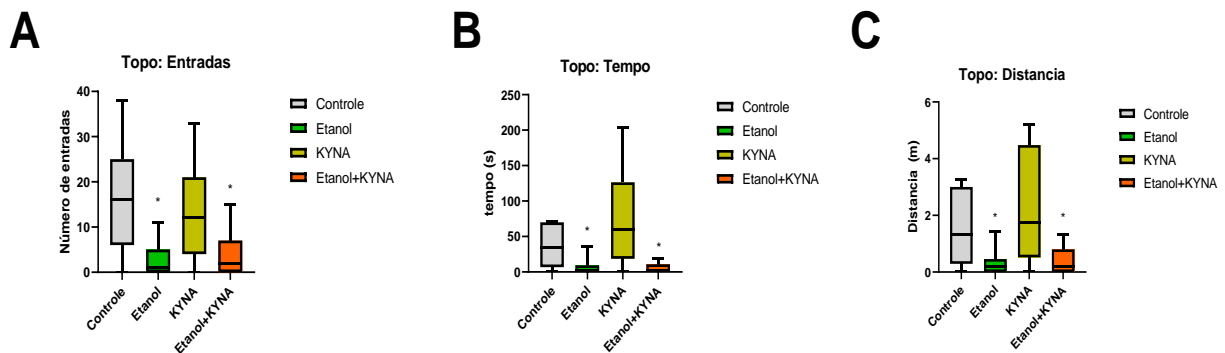


Figura 6: **A: Efeito da ERE e tratamento com KYNA sobre o número de entradas dos peixes-zebra na região do topo do tanque no teste *novel tank*.** Os resultados estão expressos em mediana e intervalo interquartil. O número de entradas está representado no eixo Y. * $p < 0,05$ em múltiplas comparações (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn). **B: Efeito da ERE e tratamento com KYNA sobre o tempo de permanência dos peixes-zebra no topo do tanque durante o teste *novel tank*.** Os resultados são expressos em mediana e intervalo interquartil. O tempo de permanência está representado no eixo Y em segundos (s). * $p < 0,05$ em múltiplas comparações (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn). **C: Efeito do ERE tratamento com KYNA sobre a distância percorrida pelos peixes-zebra na região do meio do tanque durante o teste *novel tank*.** Os resultados são expressos como mediana e intervalo interquartil. A distância percorrida está representada no eixo Y em metros por segundo (m/s). * $p < 0,05$ em multiplas comparações (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

4.2.5 Avaliação do comportamento de freezing no tanque dos dos animais expostos ao etanol e tratados com KYNA no teste *novel tank*

Para verificar o impacto do etanol e do tratamento com ácido quinurênico (KYNA) no comportamento de *freezing*, foram avaliados os episódios de *freezing*, o tempo de *freezing* e a latência de *freezing* no fundo do tanque (Figura 7). O grupo controle apresentou uma média de 64 episódios de *freezing*. O grupo etanol mostrou uma leve

redução no número de episódios, com uma média de 50 episódios, embora sem significância estatística em comparação ao controle. Por outro lado, o tratamento isolado com KYNA não alterou significativamente o número de episódios, apresentando uma média de 72 episódios. Interessantemente, o grupo Etanol+KYNA apresentou uma redução significativa nos episódios de *freezing*, com uma média de 32 episódios, sugerindo que o KYNA modulou o efeito do etanol (ANOVA, $p = 0,007$; teste de Tukey, $p = 0,022$).

No que diz respeito ao tempo de *freezing* no fundo do tanque, o grupo controle apresentou um tempo médio de 4,2 segundos. Já o grupo etanol apresentou uma leve diminuição no tempo de *freezing*, alcançando 1,9 segundos, mas sem significância estatística. O tratamento com KYNA, quando administrado de forma isolada, resultou em um aumento leve no tempo de *freezing* para 2,55 segundos. O grupo Etanol+KYNA apresentou o menor tempo de *freezing*, com uma média de 0,52 segundos, sugerindo que o KYNA pode atenuar o efeito do etanol (ANOVA, $p = 0,036$; teste de Tukey, $p = 0,025$).

Por fim, ao avaliar a latência para o primeiro episódio de *freezing*, o grupo controle apresentou uma latência média de 7.697 segundos. O grupo etanol apresentou uma latência semelhante, com uma média de 7.747 segundos. O grupo tratado apenas com KYNA apresentou uma latência reduzida para 4.601 segundos, sem alteração significativa em comparação ao controle. Interessantemente, o grupo Etanol+KYNA apresentou uma latência aumentada para 8.323 segundos (ANOVA, $p = 0,0048$; teste de Tukey, $p = 0,030$), sugerindo que o KYNA pode exercer um efeito protetor contra o aumento do comportamento de *freezing* induzido pelo etanol.

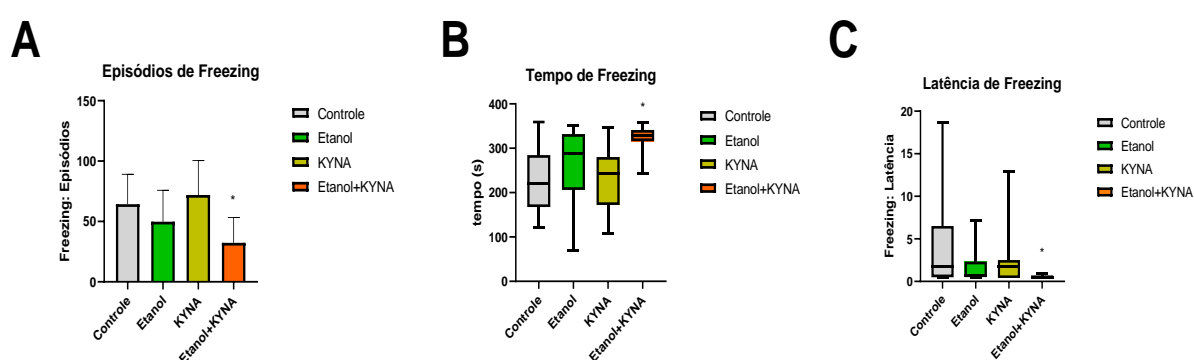


Figura 7: **A: Efeito da ERE e tratamento com KYNA sobre o número de episódios de freezing dos peixes-zebra no teste *novel tank*.** Os resultados estão expressos em média e desvio padrão. O número de entradas está representado no eixo Y. * $p < 0,05$ em múltiplas comparações (ANOVA de uma via seguido

do teste de Tukey). **B: Efeito da ERE e tratamento com KYNA sobre o tempo de freezing dos peixes-zebra durante o teste *novel tank*.** Os resultados são expressos em mediana e intervalo interquartil. O tempo de permanência está representado no eixo Y em segundos (s). * $p < 0,05$ em múltiplas comparações (Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn). **C: Efeito do ERE e tratamento com KYNA sobre a latência de freezing apresentada pelos peixes-zebra durante o teste *novel tank*.** Os resultados são expressos como mediana e intervalo interquartil. A distância percorrida está representada no eixo Y em metros por segundo (m/s). Em múltiplas comparações (Kruskal-Wallis, seguida pelo teste de Dunn).

5 DISCUSSÃO

A presente investigação focou-se nos efeitos neuroquímicos e comportamentais do ácido quinurênico (KYNA) em peixes-zebra submetidos à exposição repetitiva ao etanol, com o objetivo de elucidar a viabilidade do KYNA como agente ansiolítico em cenários da ansiedade gerada pelo álcool. A exposição repetida ao etanol causou alterações substanciais nos sistemas colinérgico e glutamatérgico em peixes-zebra, levando a comportamentos indicativos de ansiedade, como aumento do freezing e diminuição da atividade exploratória. O KYNA foi avaliado como uma possível intervenção para mitigar esses efeitos. Embora esta molécula tenha mostrado um efeito parcial ao reduzir a frequência dos episódios de freezing e aumentar a atividade exploratória, ele não foi capaz de restaurar completamente os padrões normais de neurotransmissão, nem atuar totalmente na redução dos comportamentos ansiosos induzidos pelo etanol. Esses resultados sugerem que, apesar de seu potencial neuroprotetor, o KYNA pode ter uma eficácia limitada como modulador em cenários de ansiedade provocada pelo álcool, ressaltando a complexidade de sua interação com as vias neuroquímicas afetadas pelo etanol.

Estudos têm destacado a relevância do teste *novel tank* na pesquisa neurofarmacológica devido à sua simplicidade e sensibilidade para detectar mudanças comportamentais induzidas por substâncias ansiogênicas e ansiolíticas. Como discutido por Stewart et al. (2010) em sua revisão sobre modelagem de ansiedade usando peixes-zebra adultos, esse teste é uma ferramenta valiosa para investigar os efeitos de tratamentos, como a administração de ácido quinurênico, nos padrões de ansiedade induzidos por substâncias como o álcool.

O etanol, conhecido por alterações a homeostase neuroquímica, promove mudanças notáveis nos sistemas colinérgico e glutamatérgico, o que, por sua vez, resulta em estados de hiperexcitabilidade sináptica e alterações comportamentais, incluindo ansiedade exacerbada (Crews, 2018; Gilpin; Herman; Roberto, 2015). Neste contexto, o

KYNA foi avaliado por sua capacidade de atenuar os efeitos do etanol, modulando a neurotransmissão excitatória e reduzindo comportamentos ansiogênicos.

Os resultados desta pesquisa indicam que o grupo etanol apresentou uma inibição significativa da atividade da enzima AChE nos encéfalos dos peixes-zebra em comparação com o grupo controle. No entanto, essa diferença não alcançou significância estatística nos demais grupos (Sizer; Parrish; McCool, 2021). A literatura descreve o etanol como um agente capaz de alterar a neurotransmissão colinérgica. Estes dados, indicam que a exposição crônica ao etanol modula a neurotransmissão colinérgica, especialmente ao aumentar a atividade dos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) na amígdala basolateral, o que pode resultar em mudanças comportamentais como a ansiedade (Sizer; Parrish; McCool, 2021).

A administração de ácido quinurênico (KYNA), por outro lado, não foi capaz de restaurar completamente a atividade da AChE aos níveis do grupo controle, seja quando administrado isoladamente ou em combinação com etanol. Este efeito parcial do KYNA sugere que, embora tenha propriedades neuroprotetoras e moduladoras, sua eficácia na reversão da inibição da AChE induzida pelo etanol se mostra limitada. Estes achados enfatizam a importância promissora de investigações futuras para explorar os mecanismos específicos de ação do KYNA, especialmente em contextos de disfunção colinérgica induzida pelo etanol, e sua potencial aplicação em intervenções farmacológicas voltadas à modulação da ansiedade e outros distúrbios neuropsiquiátricos (Rico et al., 2007; Rosemberg et al., 2010; Bernardo et al., 2019; Torres et al., 2021).

Além disso, os achados desta pesquisa sugerem que a limitação do KYNA em atenuar as alterações na atividade da AChE promovidas pelo etanol pode estar relacionada a mecanismos específicos de sua interação com os receptores colinérgicos e as vias de sinalização associadas. Estudos indicam que o KYNA atua como antagonista não competitivo dos receptores $\alpha 7$ -nicotínicos, influenciando a neurotransmissão colinérgica e podendo ter um efeito limitado em contextos como o da inibição induzida pelo etanol (Rossi et al., 2019). Apesar do KYNA ser reconhecido por sua eficácia na modulação do sistema glutamatérgico, as nuances de sua ação sobre a AChE, especialmente em cenários de exposição crônica ao etanol, requerem investigação adicional. Em nosso estudo, mostramos que, embora o KYNA atue diretamente na sinalização glutamatérgica, ele pode indiretamente exercer efeitos moduladores sobre o

sistema colinérgico, como evidenciado pela sua capacidade de mitigar parcialmente a inibição da AChE causada pelo etanol. Esses achados sugerem que o KYNA pode influenciar múltiplas vias neuroquímicas, ainda que de forma indireta, destacando a complexidade de sua ação em cenários de disfunção sináptica induzida por substâncias. Estudos futuros devem focar na compreensão dessas interações complexas e na possibilidade de combinação do KYNA com outros agentes terapêuticos que possam complementar suas funções neuroprotetoras, especialmente no contexto de alterações colinérgicas induzidas pelo álcool (King et al., 2007; Pocivavsek; Erhardt, 2024).

A neurotransmissão glutamatérgica, fundamental para a excitação sináptica, é particularmente vulnerável as ações causadas pelo etanol. Neste estudo, observou-se uma redução na captação de glutamato nos peixes expostos ao etanol, embora essa redução não tenha sido estatisticamente significativa, este resultado está em concordância com a literatura, que associa a exposição ao etanol à diminuição da neurotransmissão excitatória e ao aumento da neurotoxicidade (Beckley et al., 2016). A redução na captação de glutamato sugere um estresse neuroquímico, que pode ser agravado pela exposição contínua ao etanol, comprometendo a eficiência sináptica e contribuindo para o desenvolvimento de comportamentos ansiosos (Cachat et al., 2010)

O ácido quinurênico (KYNA) foi utilizado como uma intervenção devido às suas propriedades neuroprotetoras conhecidas, particularmente sua capacidade de antagonizar os receptores NMDA e atenuar a excitotoxicidade induzida pelo glutamato (Campbell et al., 2014). Contudo, os resultados indicaram que o tratamento com KYNA não foi efetivo frente a alteração aos níveis observados no grupo controle, sugerindo que a ansiedade induzida pelo etanol pode estar relacionada à disfunção persistente na neurotransmissão glutamatérgica, que o KYNA isoladamente, não foi capaz de modular de forma eficaz. Este achado está em consonância com a literatura que aponta para a complexidade das alterações neuroquímicas induzidas pelo etanol, que influenciam múltiplos sistemas de neurotransmissão. O estudo de Erickson et al. (2018) indicou que a exposição prolongada ao etanol pode levar a alterações duradouras nos circuitos glutamatérgicos, aumentando a vulnerabilidade ao desenvolvimento de comportamentos ansiosos

O potencial terapêutico KYNA em condições de estresse crônico, como a ansiedade induzida pelo uso prolongado de etanol, pode ser melhor compreendido à luz

das complexidades discutidas por Stone e Darlington (2013) e Leclercq et al. (2021). Stone e Darlington apontam que, embora o KYNA possua propriedades neuroprotetoras, sua eficácia pode ser modulada negativamente pela presença de metabólitos neurotóxicos, como o ácido quinolínico. Essa observação sugere que, em contextos de ansiedade induzida pelo álcool, onde o equilíbrio entre KYNA e outros metabólitos é crucial, o efeito isolado do KYNA pode ser insuficiente para mitigar os danos ou até mesmo as alterações neuroquímicas.

Além disso, Leclercq et al. (2021) enfatizam a influência do microbioma intestinal e do metabolismo do triptofano na regulação do KYNA, particularmente em distúrbios relacionados ao uso de álcool. Essa perspectiva reforça a necessidade de abordagens terapêuticas combinadas que considerem não apenas a modulação direta do KYNA, mas também as interações complexas entre as vias metabólicas e o sistema nervoso central. Portanto, ao integrar essas visões, fica evidente que o tratamento da ansiedade induzida pelo etanol pode exigir intervenções que vão além da simples administração de KYNA, abrangendo também estratégias para equilibrar os múltiplos fatores neuroquímicos envolvidos.

A análise comportamental revelou que a exposição ao etanol causou uma diminuição significativa na distância percorrida e na velocidade média dos peixes-zebra, sugerindo um aumento no comportamento ansioso. Esses resultados corroboram estudos anteriores que identificam a redução na exploração como um marcador de ansiedade em peixes-zebra (Mathur; Guo, 2011). Conforme observado por Tran e Gerlai (2013), o etanol induz um estado de ansiedade que limita a exploração de novos ambientes, conforme também relatado por Cachat et al. (2010) e Egan et al. (2009). No contexto desta pesquisa, isso destaca o desafio de reverter as alterações comportamentais induzidas pelo etanol, mesmo com a administração de ácido quinurênico (KYNA).

No entanto, o tratamento com KYNA, seja isoladamente ou em combinação com o etanol, não alterou o padrão de exploração observado no grupo controle. Este resultado sugere que, o KYNA não apresentou propriedades suficientemente eficazes para reverter os efeitos ansiogênicos induzidos pelo etanol. Conforme discutido por Osuch et al. (2024), a modulação da via do quinurenina, incluindo o ácido quinurênico, pode ser importante, mas sua eficácia é limitada em contextos onde o etanol compromete profundamente o

sistema nervoso central. Ao analisar o número de cruzamentos de linha, os grupos tratados com KYNA de forma isolada não apresentaram diferença significativa. No entanto, os grupos expostos ao etanol e tratados com KYNA apresentaram uma redução significativa no número de cruzamentos de linha, confirmando o efeito ansiolítico do KYNA no comportamento exploratório dos animais.

A análise dos dados comportamentais nas três zonas do tanque (fundo, meio e topo) revelou que os peixes-zebra exibiram diferentes padrões de comportamento em resposta aos tratamentos aplicados (etanol, KYNA, e etanol + KYNA), conforme apresentado nos gráficos anexados. No gráfico A, referente ao fundo do tanque, o número de entradas foi significativamente menor nos grupos tratados com etanol e etanol + KYNA em comparação com o controle, conforme indicado pelos asteriscos. Essa redução sugere um comportamento mais ansioso, já que os peixes tendem a evitar a exploração do fundo sob condições de estresse ou ansiedade, como também observado em estudos anteriores (Blaser et al., 2010). O tempo gasto no fundo do tanque (gráfico B) foi significativamente maior nos peixes tratados com KYNA isoladamente, o que pode indicar um efeito modesto do KYNA na modulação da ansiedade, ainda que sem restaurar completamente o comportamento exploratório observado no grupo controle.

No que diz respeito à área intermediária do tanque, o gráfico A mostra que o número de entradas foi significativamente menor nos grupos expostos ao etanol e KYNA em comparação com o grupo controle, confirmando a hipótese de que o etanol aumenta a ansiedade dos peixes, levando-os a explorar menos as áreas abertas do tanque (Stewart et al., 2015). O gráfico B reforça esse achado, indicando que o tempo gasto no meio do tanque também foi significativamente reduzido nos grupos expostos ao etanol e KYNA, o que pode refletir uma maior aversão à exploração de áreas mais expostas, uma característica comum de comportamentos ansiosos.

Finalmente, o gráfico referente ao topo do tanque revela uma redução significativa no número de entradas e no tempo gasto nessa área pelos grupos tratados com etanol e KYNA. Esses resultados estão em consonância com a literatura, que associa o aumento da ansiedade à preferência por áreas menos expostas, como o fundo do tanque (Egan et al., 2009). Os peixes do grupo controle exploraram o topo do tanque de forma mais consistente, indicando uma menor aversão à área mais exposta e, portanto, menor ansiedade. O tratamento com KYNA não foi capaz de reverter completamente o

comportamento ansioso induzido pelo etanol, sugerindo que, embora o KYNA tenha propriedades neuroprotetoras, ele não foi eficaz o suficiente para restaurar o comportamento exploratório normal dos peixes.

Esses achados reforçam a complexidade das interações entre o etanol e o KYNA no sistema nervoso central, indicando que a modulação da ansiedade pelo KYNA pode ser limitada em certos contextos. Estudos futuros são necessários para explorar essas interações em maior profundidade e determinar como diferentes dosagens ou combinações com outras substâncias podem influenciar os resultados comportamentais.

Os achados deste estudo revelaram nuances importantes sobre o comportamento de freezing em peixes-zebra expostos ao etanol e tratados com KYNA, evidenciando desafios na modulação dos comportamentos ansiosos induzidos pelo álcool. O aumento nos episódios de freezing observado nos grupos expostos ao etanol reforça a ideia de que o etanol atua como um potente agente ansiogênico, induzindo comportamentos de medo e ansiedade, possivelmente através da sensibilização dos circuitos neurais envolvidos na resposta ao medo. Este efeito é consistente com a literatura, incluindo os achados de Cachat et al. (2010), que demonstram a eficácia do teste de mergulho em tanque novo para detectar alterações de comportamento ansioso em peixes-zebra, destacando que, embora o KYNA tenha potencial neuroprotetor, ele não conseguiu mitigar de forma significativa os efeitos ansiogênicos induzidos pelo etanol.

O aumento no tempo de freezing nos grupos expostos ao etanol sugere que o álcool intensifica o comportamento ansioso, provavelmente devido à sensibilização dos circuitos neurais responsáveis pelas respostas de medo. O Desafio do KYNA de reduzir esse efeito indica que, embora tenha propriedades neuroprotetoras, ele isoladamente, pode ser insuficiente para reverter os impactos do etanol em casos de ansiedade crônica. Esses achados, conforme Wiggins et al. (2021), sublinham a necessidade de intervenções terapêuticas mais eficazes, que possam abordar as vias neuroquímicas moduladas pelo etanol.

A redução na latência para o início do freezing nos grupos expostos ao etanol, que permaneceu inalterada mesmo com a administração de KYNA, sugere que o etanol pode diminuir o limiar de ativação das respostas de medo, um efeito que o KYNA não conseguiu neutralizar. Esses resultados indicam que a eficácia isolada do KYNA pode ser insuficiente para contrabalançar os efeitos do etanol sobre os circuitos de medo e

ansiedade. De forma similar, a tese de Pinheiro-da-Silva (2021) discute como o etanol, em modelos de peixes-zebra, influencia comportamentos relacionados à ansiedade, destacando a complexidade das respostas comportamentais ao álcool e a importância de estratégias terapêuticas que abordem múltiplos mecanismos neurobiológicos. Essa conexão reforça a necessidade de explorar terapias combinadas para potencializar os efeitos neuroprotetores do KYNA.

O KYNA é reconhecido por suas propriedades neuroprotetoras, especialmente pela sua capacidade de modular receptores NMDA e AMPA, que são cruciais para a regulação dos comportamentos relacionados ao medo e à ansiedade. Conforme destacado por Sas et al. (2018), o KYNA pode ter limitações em contextos de estresse induzido pelo etanol, onde a ansiedade é exacerbada. Isso sugere a necessidade de estratégias terapêuticas combinadas para maximizar a eficácia do KYNA na modulação dos circuitos ansiosos comprometidos pelo álcool.

Estudos recentes, como o de Walczak et al. (2020), indicam que o KYNA exerce um efeito protetor significativo no sistema nervoso, especialmente ao inibir vias de sinalização envolvidas na apoptose e na inflamação, como a via da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK). Essas características tornam o KYNA um candidato promissor no contexto de neuroproteção, inclusive em situações de estresse crônico induzido por substâncias como o etanol. Além disso o estudo de Venkatesan et al. (2020) explora o papel do KYNA no contexto da neurodegeneração, destacando sua capacidade de proteger neurônios dopaminérgicos contra danos excitotóxicos, especialmente no contexto de doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson. Essa propriedade é particularmente relevante em situações de estresse crônico, como aquelas induzidas pelo etanol.

O KYNA desempenha um papel significativo na neuroproteção, particularmente em condições neurodegenerativas. Conforme discutido por Ostapiuk e Urbanska (2022), ajudando a atenuar a excitotoxicidade e a reduzir a inflamação cerebral. No entanto, o equilíbrio entre KYNA e outros metabólitos da via do quinurenina, como o ácido quinolínico, é crucial para determinar o impacto final no cérebro, especialmente em contextos de doenças neurodegenerativas.

Em condições de doenças neurodegenerativas, no caso, Alzheimer, caracterizada por perda progressiva de memória e declínio cognitivo, esta envolve múltiplos

mecanismos neuroquímicos, entre os quais a via do quinurenina, responsável pelo catabolismo do triptofano, tem sido amplamente investigada. (Fathi et al, 2022) Dentro dessa via, o ácido quinurênico (KYNA) se destaca por suas propriedades neuroprotetoras, atuando como antagonista dos receptores NMDA e dos receptores nicotínicos de acetilcolina ($\alpha 7nACh$), além de exercer uma função antioxidante (Fathi et al, 2022). Essas características fazem do KYNA um possível modulador glutamatérgico envolvendo a plasticidade sináptica e formação de memória, comprometida da DA. Essas informações, reforçam a importância de se aprofundar na compreensão do papel do KYNA como possível agente neuroprotetor e biomarcador, assim como sua influência no equilíbrio neuroquímico relacionado à progressão da DA.

A depressão é uma condição de natureza multifatorial, sendo influenciada por diferentes fatores, incluindo alterações no metabolismo do triptofano. Dentro deste contexto, a via da quinurenina exerce um papel crucial na regulação da neuroquímica cerebral. Estudos indicam que a ativação exacerbada dessa via pode induzir efeitos neurotóxicos, contribuindo para o desenvolvimento de sintomas depressivos, especialmente pela produção de metabólitos como o ácido quinolínico, que está associado à inflamação e disfunção neuronal (Correia; Vale, 2022). Além da disfunção na produção de ácido quinurênico (KYNA), o metabolismo desregulado do triptofano também resulta no aumento dos níveis de ácido quinolínico (QUIN), um metabólito neurotóxico fortemente relacionado a danos no hipocampo, uma região cerebral essencial para o controle do humor (Hestad et al., 2022). Estudos sugerem que o ácido quinolínico, ao atuar como agonista dos receptores NMDA, contribui para a excitotoxicidade e está envolvido em processos neurodegenerativos e de disfunção neuronal, afetando áreas como o hipocampo (Hestad et al., 2022).

Segundo Athnail et al. (2022), o aumento de QUIN em pacientes com depressão exacerba os sintomas depressivos, indicando que o desequilíbrio na via da quinurenina, especialmente em contextos de inflamação crônica, desempenha um papel central na patogênese da doença. Dessa forma, fica claro que tanto o aumento de QUIN quanto a redução de KYNA contribuem para a disfunção neuroquímica observada na depressão.

Este metabólito da via das quinureninas, tem sido amplamente associado à fisiopatologia da esquizofrenia. Este composto age como um antagonista endógeno dos receptores NMDA, que desempenham um papel crucial na neurotransmissão

glutamatérgica. Estudos indicam que níveis elevados de KYNA no sistema nervoso central estão presentes em pacientes com esquizofrenia, possivelmente devido a uma condição pró-inflamatória que altera o metabolismo do triptofano. Esse aumento do KYNA pode contribuir para a disfunção da neurotransmissão glutamatérgica, levando a alterações neurológicas responsáveis pelo desenvolvimento dos sintomas da esquizofrenia, incluindo déficits cognitivos e alterações no comportamento (Cunha, Bachur e Aragão, 2020).

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que o ácido quinurênico (KYNA) exerce um papel relevante na modulação dos efeitos comportamentais e bioquímicos induzidos pelo etanol em peixes-zebra. Os dados demonstram que o etanol afeta significativamente os sistemas colinérgico e glutamatérgico, alterando a neurotransmissão e promovendo respostas ansiogênicas. O KYNA, embora tenha sido demonstrado pela literatura seu potencial neuroprotetor, apresentou algumas resistências e dificuldades em restaurar os níveis funcionais em comparação ao grupo controle e suas funções alteradas pelo etanol. No entanto, sua ação moduladora, especialmente no comportamento exploratório e no comportamento de freezing, destaca a importância de futuras investigações sobre o potencial terapêutico deste metabólito em contextos de ansiedade induzida por substâncias como o álcool. Esses achados sugerem que o KYNA pode ser uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de novas intervenções farmacológicas voltadas para a modulação dos sistemas neuroquímicos comprometidos pelo etanol, com possíveis aplicações no tratamento de distúrbios relacionados ao uso de álcool, talvez com sua administração em outras doses ou outros protocolos, possa a vir a exercer seu papel de forma mais eficaz.

7 REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, J. F. et al. Cholinergic system and oxidative stress changes in the brain of a zebrafish model chronically exposed to ethanol. *Neurotoxicology Research*, v. 33, p. 749-758, 2018.
- ALBUQUERQUE, E. X.; SCHWARCZ, R. Kynurenic acid as an antagonist of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in the brain: facts and challenges. *Biochemical Pharmacology*, v. 85, n. 8, p. 1027-1032, 2013. DOI: 10.1016/j.bcp.2012.12.014.
- ALEXANDRE, M. C. M. et al. Weekly ethanol exposure alters dopaminergic parameters in zebrafish brain. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 75, p. 106822, 2019.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5-TR. 5. ed. ver. Porto Alegre: Artmed, 2023.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA). Pharmacotherapy for Alcohol Use Disorder. APA guidelines, 2018.
- AMIRKHANI, A.; HELDIN, E.; MARKIDES, K. E.; BERGQUIST, J. Quantitation of tryptophan, kynurenine and kynurenic acid in human plasma by capillary liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 780, p. 381-387, 2002.
- ATHNAIEL, O.; ONG, C.; KNEZEVIC, N. N. The role of kynurenine and its metabolites in comorbid chronic pain and depression. *Metabolites*, v. 12, n. 950, p. 1-12, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/metabo12100950>. Acesso em: 6 out. 2022.
- BECKLEY, J. T. et al. The first alcohol drink triggers mTORC1-dependent synaptic plasticity in nucleus accumbens dopamine D1 receptor neurons. *Journal of Neuroscience*, v. 36, n. 3, p. 701-713, 2016. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3246-15.2016.
- BERNARDO, H. T. et al. Cholinergic system and exploratory behavior are changed after weekly-binge ethanol exposure in zebrafish. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 186, p. 172790, 2019.
- BEHRA, M. et al. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nature Neuroscience*, v. 5, n. 2, p. 111-118, 2002.
- BLANK, M.; GUERIM, L. D.; CORDEIRO, R. F.; VIANNA, M. R. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 92, n. 4, p. 529-534, 2009.
- BOEHMLER, W. et al. Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. *Developmental Dynamics*, v. 230, n. 3, p. 481-493, 2004.
- CACHAT, J. M. et al. Examining behavioural test sensitivity and locomotor proxies of anxiety-like behaviour in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, v. 214, n. 1, p. 38-44, 2010. DOI: 10.1016/j.bbr.2010.04.041.

CACHAT, J. M. et al. Measuring behavioral and endocrine responses to novelty stress in adult zebrafish. *Nature Protocols*, v. 5, n. 11, p. 1786-1799, 2010. DOI: 10.1038/nprot.2010.140.

CAMPBELL, B. M.; CHARYCH, E.; LEE, A. W.; MÖLLER, T. Kynurenines in CNS disease: regulation by inflammatory cytokines. *Frontiers in Neuroscience*, v. 8, p. 12, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00012>. Acesso em: 04 set. 2024.

CLARK, D. A.; BECK, A. T. Terapia cognitiva para os transtornos de ansiedade: ciência e prática. Porto Alegre: Artmed, 2012. 640 p.

COLEMAN, P. A.; MASSEY, S. C.; MILLER, R. F. Kynurenic acid distinguishes kainate and quisqualate receptors in the vertebrate retina. *Brain Research*, v. 381, n. 1, p. 172-175, 1986. DOI: 10.1016/0006-8993(86)90708-0.

CORREIA, A. S.; VALE, N. Tryptophan Metabolism in Depression: A Narrative Review with a Focus on Serotonin and Kynurenine Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 15, p. 8493, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23158493>. Acesso em: 8 out. 2024.

CREWS F.T. Alcohol and neurodegeneration. *Alcohol Research*, v. 39, n. 2, p. 155-171, 2018.

CSEH, E. K.; VECSEI, L. Natural molecules and neuroprotection: Kynurenic acid, pantethine and α -lipoic acid. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 1, p. 403, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22010403>. Acesso em: 15 set. 2024.

CUNHA, S. F.; BACHUR, T. P. R.; ARAGÃO, G. F. A via das quinureninas e suas implicações na esquizofrenia. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 19, n. 1, p. 139-143, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.9771/cmbio.v1i1.33570>. Acesso em: 4 set. 2024.

DAHCHOUR, A.; DEVILLE, C.; DE WITTE, P. Effects of Acamprosate on Extracellular Glutamate Levels in the Nucleus Accumbens after Ethanol Withdrawal. *European Journal of Pharmacology*, v. 311, n. 3, p. 253-257, 1996.

DAHCHOUR, A.; DEVILLE, C.; MARET, S.; DE WITTE, P. Ethanol Induces an Increase in Extracellular Glutamate in the Nucleus Accumbens of the Freely Moving Rat: An in Vivo Microdialysis Study. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 22, n. 3, p. 1235-1240, 1998.

DENNISON, Z.; OSSENKOPP, K. P.; CAIN, D. P. Effects of central administration of kynurenic acid on spontaneous locomotor activity in the kindled rat: a multivariate approach using the automated Digiscan monitoring system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 43, p. 807-814, 1992.

DE WITTE, P. et al. Alcohol and withdrawal: from animal research to clinical issues. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 27, n. 3, p. 189-197, 2003. DOI: 10.1016/s0149-7634(03)00030-7.

EDWARDS, J. G.; MICHEL, W. C. Odor-stimulated glutamatergic neurotransmission in the zebrafish olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*, v. 454, n. 3, p. 294-309, 2002.

EGAN, R. J. et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, v. 205, n. 1, p. 38-44, 2009. DOI: 10.1016/j.bbr.2009.06.022.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, p. 88-95, 1961.

ERABI, Hisayuki et al. Kynurenic acid is a potential overlapped biomarker between diagnosis and treatment response for depression from metabolome analysis. *Scientific Reports*, v. 10, n. 16822, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73918-z>. Acesso em: 4 set. 2024.

ERICKSON, E. K. et al. Ethanol-induced alterations in glutamate and GABA function in the central amygdala: Implications for ethanol dependence. *Biological Psychiatry*, v. 83, n. 11, p. 830-839, 2018. DOI: 10.1016/j.biopsych.2017.10.015.

ESEL, E.; DINC, C. Alcohol Use Disorder: Neuroscience and Psychological Perspectives. *Journal of Addiction Research & Therapy*, v. 8, n. 3, p. 123-130, 2017.

FROEHLICHER, M. et al. Zebrafish (*Danio rerio*) neuromast: promising biological endpoint linking developmental and toxicological studies. *Aquatic Toxicology*, v. 95, n. 4, p. 307-319, 2009.

FUCHS F.D. et al. Alcohol intake and cardiovascular risk: the role of hypertension and other mechanisms. *Am J Epidemiol*. 2001;153(4):329-334.

FULLER, R. K.; GORDIS, E. O dissulfiram tem um papel no tratamento do alcoolismo hoje? *Addiction*, v. 99, n. 1, p. 21-24, 2004.

GANONG, A. H.; COTMAN, C. W. Kynurenic acid and quinolinic acid act at N-methyl-D-aspartate receptors in the rat hippocampus. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 236, p. 293-299, 1986.

GILPIN, N. W.; HERMAN, M. A.; ROBERTO, M. The central amygdala as an integrative hub for anxiety and alcohol use disorders. *Biological Psychiatry*, v. 77, n. 10, p. 859-869, 2015.

GILPIN, N. W.; WEINER, J. L. Neurobiology of co-morbid post-traumatic stress disorder and alcohol-use disorder. *Genes, Brain and Behavior*, v. 16, n. 1, p. 15-43, 2017.

GERLAI, R.; LAHAV, M.; GUO, S.; ROSENTHAL, A. Drinks like a fish: zebrafish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 67, n. 4, p. 773-782, 2000.

GERLAI, R.; LEE, V.; BLASER, R. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 85, n. 4, p. 752-761, 2006.

GOLDSMITH, P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 4, n. 5, p. 504-512, 2004.

GUO, W. et al. Application of Disulfiram and its Metabolites in Treatment of Inflammatory Disorders. *Frontiers in Pharmacology*, v. 12, p. 795078, 2022. DOI: 10.3389/fphar.2021.795078.

GUPTA, T.; MULLINS, M. C. Dissection of organs from the adult zebrafish. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*, 2010. Disponível em: <https://www.jove.com>. Acesso em: 29 ago. 2024.

HARTAI, Z. et al. Decreased serum and red blood cell kynurenic acid levels in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, v. 50, p. 308-313, 2007.

HILMAS, C. et al. The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *Journal of Neuroscience*, v. 21, p. 7463-7473, 2001.

HORZMANN, K. A.; FREEMAN, J. L. Making Waves: New Developments in Toxicology With the Zebrafish. *Toxicological Sciences*, v. 163, n. 1, p. 5-12, 2018.

ILHAN, M. N.; YAPAR, D. Alcohol consumption and alcohol policy. *Turkish Journal of Medical Sciences*, v. 50, n. 5, p. 1197-1202, 2020. DOI: 10.3906/sag-2002-237.

JAMA NETWORK. Pharmacotherapy for Alcohol Use Disorder. *JAMA*, 2024.

JONAS, D. E. et al. Pharmacotherapy for Adults With Alcohol Use Disorders in Outpatient Settings: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of the American Medical Association*, v. 311, n. 18, p. 1889-1900, 2014.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 35, n. 2, p. 63-75, 2014.

KIM, Y. J.; NAM, R. H.; YOO, Y. M.; LEE, C. J. Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neuroscience Letters*, v. 355, n. 1-2, p. 29-32, 2004.

KING, N. J.; THOMAS, S. R. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 39, n. 12, p. 2167-2172, 2007. DOI: 10.1016/j.biocel.2007.01.004.

KOOB, G. F. The Dark Side of Emotion: The Addiction Perspective. *European Journal of Pharmacology*, v. 753, p. 73-87, 2015.

KRAMPE, H.; EHRENREICH, H. Supervised disulfiram as adjunct to psychotherapy in alcoholism treatment. *Current Pharmaceutical Design*, v. 16, n. 19, p. 2076-2090, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20559748>. Acesso em: 15 set. 2024.

LEIB, S. L. et al. Neuroprotective effect of excitatory amino acid antagonist kynurenic acid in experimental bacterial meningitis. *Journal of Infectious Diseases*, v. 173, p. 166-171, 1996.

LECLERCQ, S. et al. Alterations of kynurenine pathway in alcohol use disorder and abstinence: a link with gut microbiota, peripheral inflammation and psychological symptoms. *Translational Psychiatry*, v. 11, p. 503, 2021. DOI: 10.1038/s41398-021-01610-5.

LOPES, C. et al. Competitive antagonism between the nicotinic allosteric potentiating ligand galantamine and kynurenic acid at alpha7* nicotinic receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 322, p. 48-58, 2007.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.

MACKILLOP, J. et al. Hazardous drinking and alcohol use disorders. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 8, n. 1, p. 80, 2022. DOI: 10.1038/s41572-022-00406-1.

MACRAE, C. A.; PETERSON, R. T. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 14, n. 10, p. 721-731, 2015.

MAJLÁTH, Zsófia; TÖRÖK, Nóra; TOLDI, József; VÉCSEI, László. Memantine and Kynurenic Acid: Current Neuropharmacological Aspects. *Current Neuropharmacology*, v. 14, n. 2, p. 200-209, 2016.

MAROSI, M. et al. A novel kynurenic acid analogue: a comparison with kynurenic acid. An in vitro electrophysiological study. *Journal of Neural Transmission*, v. 117, p. 183-188, 2010.

MATHUR, P.; GUO, S. Differences of acute versus chronic ethanol exposure on anxiety-like behavioral responses in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, v. 219, n. 2, p. 234-239, 2011. DOI: 10.1016/j.bbr.2011.01.019.

MITCHELL, J. M. et al. Alcohol consumption induces endogenous opioid release in the human orbitofrontal cortex and nucleus accumbens. *Science Translational Medicine*, v. 4, n. 116, p. 116ra6, 2012.

MOGHADDAM, B.; JAVITT, D. C. Glutamate and schizophrenia: phencyclidine, N-methyl-D-aspartate receptors, and dopamine-glutamate interactions. *Annual Review of Psychology*, v. 63, p. 645-669, 2012.

MULLER, J. L. et al. Transtorno de Ansiedade Social: um estudo de caso. *Contextos Clínicos*, v. 8, n. 1, p. 67-78, 2015.

MULLER, T. E. et al. Understanding the neurobiological effects of drug abuse: Lessons from zebrafish models. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 100, p. 109873, 2020.

NESTLER, E. J. Is there a common molecular pathway for addiction? *Nature Neuroscience*, v. 8, n. 11, p. 1445-1449, 2005.

OSTAPIUK, A.; URBANSKA, E. M. Kynurenic acid in neurodegenerative disorders—unique neuroprotection or double-edged sword? *CNS Neuroscience & Therapeutics*, v. 28, n. 1, p. 19-35, 2022. DOI: 10.1111/cns.13768.

OSUCH, B.; MISZTAL, T.; PALATYŃSKA, K.; TOMASZEWSKA-ZAREMBA, D. Implications of Kynurenine Pathway Metabolism for the Immune System, Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis, and Neurotransmission in Alcohol Use Disorder. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 9, p. 4845, 2024. DOI: 10.3390/ijms25094845.

PINHEIRO-DA-SILVA, J. Investigating the Onset of Behavioral Effects of Alcohol Intake During Zebrafish Early Development. Tese (Doutorado em Neurociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2021.

- POCIVAVSEK, A.; ERHARDT, S. Kynurenic acid: translational perspectives of a therapeutically targetable gliotransmitter. *Neuropsychopharmacology*, v. 49, p. 307-308, 2024. DOI: 10.1038/s41386-023-01681-6.
- RICO, E. P. et al. Expression and functional analysis of Na(+)-dependent glutamate transporters from zebrafish brain. *Brain Research Bulletin*, v. 81, n. 4-5, p. 517-523, 2010.
- RICO, E. P. et al. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. *Toxicology Letters*, v. 174, p. 25-30, 2007.
- RICO, E. P. et al. Zebrafish neurotransmitter systems as potential pharmacological and toxicological targets. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 33, n. 6, p. 608-617, 2011.
- RINK, E.; GUO, S. The too few mutant selectively affects subgroups of monoaminergic neurons in the zebrafish forebrain. *Neuroscience*, v. 127, n. 1, p. 147-154, 2004.
- ROBINSON, K. S. et al. Psychopharmacological effects of acute exposure to kynurenic acid (KYNA) in zebrafish. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 108, p. 54-60, 2013. DOI: 10.1016/j.pbb.2013.04.002.
- ROSEMBERG, D. B. et al. Differences in Spatio-Temporal Behavior of Zebrafish in the Open Tank Paradigm after a Short-Period Confinement into Dark and Bright Environments. *PLoS ONE*, v. 6, n. 5, p. e19397, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0019397.
- ROSEMBERG, D. B. et al. NTPDase family in zebrafish: Nucleotide hydrolysis, molecular identification and gene expression profiles in brain, liver and heart. *Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry and Molecular Biology*, v. 155, n. 3, p. 230-240, 2010.
- ROSNER, S. et al. Acamprosate for alcohol dependence. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, n. 9, p. CD004332, 2010.
- ROSSETTI, Z. L.; CARBONI, S. Ethanol withdrawal is associated with increased extracellular glutamate in the rat striatum. *European Journal of Pharmacology*, v. 283, n. 1-3, p. 177-183, 1995. DOI: 10.1016/0014-2999(95)00344-k.
- ROSSI, F. et al. The Synthesis of Kynurenic Acid in Mammals: An Updated Kynurenine Aminotransferase Structural KATalogue. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 6, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00007>. Acesso em: 8 out. 2024.
- SACKERMAN, J.; DONEGAN, J. J.; CUNNINGHAM, C. S.; NGUYEN, N. N.; LAWLESS, K.; LONG, A.; BENNO, R. H.; GOULD, G. G. Zebrafish behavior in novel environments: effects of acute exposure to anxiolytic compounds and choice of *Danio rerio* line. *International Journal of Comparative Psychology*, v. 23, n. 1, p. 43-61, 2010.
- SAMHSA. Medication for the Treatment of Alcohol Use Disorder: A Brief Guide. 2015.
- SAS, K.; SZABÓ, E.; VÉCSEI, L. Mitochondria, oxidative stress, and the kynurenine system, with a focus on ageing and neuroprotection. *Molecules*, v. 23, n. 1, p. 191, 2018. DOI: 10.3390/molecules23010191.

- SENGER, M. R. et al. Ecto-5'-nucleotidase activity in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry and Molecular Biology*, v. 139, n. 2, p. 203-207, 2004.
- SHEETS, L.; AMACHER, S. L.; POSTLETHWAIT, J. Zebrafish Models for Teratology and Toxicology Research. *Toxicologic Pathology*, v. 49, n. 3, p. 458-472, 2021.
- SIZER, S. E.; PARRISH, B. C.; McCOOL, B. A. Chronic Ethanol Exposure Potentiates Cholinergic Neurotransmission in the Basolateral Amygdala. *Neuroscience*, v. 455, p. 165-176, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.12.014>. Acesso em: 8 out. 2024.
- SMITH-WARNER, S. A. et al. Alcohol and breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 90, n. 6, p. 442-447, 1998.
- SPANAGEL, R. et al. Acamprosate produces its anti-relapse effects via calcium. *Neuropsychopharmacology*, v. 39, n. 4, p. 783-791, 2014.
- STEWART, A. et al. Modeling anxiety using adult zebrafish: A conceptual review. *Behavioural Brain Research*, v. 214, n. 2, p. 225-239, 2010. DOI: 10.1016/j.bbr.2010.05.031.
- STONE, T. W.; CONNICK, J. H. Effects of Quinolinic and Kynurenic Acids on Central Neurons. In: SCHWARCZ, R. et al. *Kynurenine and Serotonin Pathways*. Boston: Springer, 1991. p. 329-336.
- STONE, T. W.; DARLINGTON, L. G. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 1, n. 8, p. 609-620, 2002.
- PRESCOTT, C.; WEEKS, A. M.; STALEY, K. J.; PARTIN, K. M. Kynurenic acid has a dual action on AMPA receptor responses. *Neuroscience Letters*, v. 402, p. 108-112, 2006.
- TRAN, S.; GERLAI, R. Time-course of behavioural changes induced by ethanol in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research*, v. 252, p. 204-213, 2013. DOI: 10.1016/j.bbr.2013.05.065.
- UEHLINGER, C. Alcoolodépendance: thérapies cognitivo-comportementales [Alcoholism: cognitive-behavioral therapy]. *Praxis (Bern 1994)*, v. 88, n. 42, p. 1731-1735, 14 out. 1999. Em francês. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10574040>. Acesso em: 30 ago. 2024.
- VALLARI, R. C.; PIETRUSZKO, R. Aldeído desidrogenase humana: mecanismo de inibição do dissulfiram. *Ciência*, v. 216, n. 4546, p. 637-639, 1982.
- VASCOTTO, S. G.; BECKHAM, Y.; KELLY, G. M. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochemistry and Cell Biology*, v. 75, n. 5, p. 479-485, 1997.
- VENGELIENE, V.; CANNELLA, N.; TAKAHASHI, T.; SPANAGEL, R. Metabolic shift of the kynurenine pathway impairs alcohol and cocaine seeking and relapse. *Psychopharmacology*, v. 233, n. 19-20, p. 3449-3459, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4403-5>. Acesso em: 13 set. 2024.

VENKATESAN, D.; IYER, M.; NARAYANASAMY, A.; SIVA, K.; VELLINGIRI, B. Kynurenine pathway in Parkinson's disease—An update. *eNeurologicalSci*, v. 21, p. 100270, 2020. DOI: 10.1016/j.ensci.2020.100270.

VEZZANI, A.; GRAMSBERGEN, J. B.; SPECIALE, C.; SCHWARCZ, R. Production of quinolinic acid and kynurenic acid by human glioma. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 294, p. 691-695, 1991.

ZAKHARI, S. Overview: How Is Alcohol Metabolized by the Body? *Alcohol Research & Health*, v. 29, n. 4, p. 245-254, 2006.

WALCZAK, K. et al. Kynurenic acid and cancer: facts and controversies. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 77, n. 8, p. 1531-1550, 2020. DOI: 10.1007/s00018-019-03332

WU, H. Q.; SCHWARCZ, R.; SHEPARD, P. D. Excitatory amino acid-induced excitation of dopamine-containing neurons in the rat substantia nigra: modulation by kynurenic acid. *Synapse*, v. 16, p. 219-230, 1994.

WU, H. Q. et al. The astrocyte-derived alpha7 nicotinic receptor antagonist kynurenic acid controls extracellular glutamate levels in the prefrontal cortex. *Journal of Molecular Neuroscience*, v. 40, p. 204-210, 2010.

YANG, L. et al. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reproductive Toxicology*, v. 28, n. 2, p. 245-253, 2009.

YOSHIDA, J. et al. Intracerebroventricular injection of kynurenic acid attenuates corticotrophin-releasing hormone-augmented stress responses in neonatal chicks. *Neuroscience*, v. 220, p. 142-148, 2012.



**Universidade do Extremo Sul
Catarinense Comissão de Ética no Uso
de Animais (ANEXO I)**



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 **26/09/2023**.

Título do projeto	Clique aqui para adicionar o título do projeto em português Avaliação dos efeitos do ácido quinurênico nos padrões ansiogênicos induzidos pela exposição repetitiva ao etanol no peixe-zebra.
Project title	Evaluation of the effects of kynurenic acid on ansiogenic patterns induced by repetitive exposure to ethanol in zebrafish..
Número do protocolo Protocol number	63/2023
Pesquisador principal Principal Investigator	Eduardo Pacheco Rico
Pesquisadores Researchers	Amanda Gomes Teixeira, Ana Caroline Salvador de Farias, Daiana Alves Spilere, Eduardo Ronconi Dondossola, Guilherme Lodetti da Silva, Karolyne de Pieri Picler, Manolo Guilherme Roso, Vitória Padilha da Silva.
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	29/09/2023 a 12/09/2024
Espécie/linhagem/raça	Peixe** / Danio rerio
Idade/Peso	4 meses / 0,400g
Número de animais	Masculino 114 + Feminino 114 = 228
Procedência	Biotério UNESC

Obs.: retirar as fêmeas e inserir o dobro de machos.

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
Josiane Budni

Coordenadora da CEUA

Criciúma-SC, 26 de
setembro de 2023

ANEXO II



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

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO DE OBRA
 Tese, dissertação, livro, capítulo de livro, artigo, outros

1) DADOS DO AUTOR

- 1.1 Nome: Momelo Guilherme Rosa
 1.2 CPF: 019.323.830.69
 1.3 Vínculo com a instituição: acadêmico de pós graduação Stricto Sensus
 (acadêmico de pós graduação stricto sensu, docente, pesquisador, técnico-administrativo)

2) INFORMAÇÕES DA OBRA

- 2.1 Identificação da obra: dissertação
 (tese, dissertação, livro, capítulo de livro, artigo, outros)
 2.2 Título da obra: Efeitos de sãdo quimurêmica nos produtos
 amigáveis induzidos pelo exposição repetitiva ao
 álcool no pixel Zbro.

Na qualidade de titular dos direitos autorais relativos à obra acima descrita, o autor, com fundamento no artigo 29 da Lei n. 9.610/1998, autoriza a UNESC – Universidade do Extremo Sul Catarinense, a disponibilizar gratuitamente sua obra, sem ressarcimento de direitos autorais, para fins de leitura, impressão e/ou download pela internet, a título de divulgação da produção científica gerada pela UNESC, nas seguintes modalidades: a) disponibilização impressa no acervo da Biblioteca Prof. Eurico Back; b) disponibilização em meio eletrônico, em banco de dados na rede mundial de computadores, em formato especificado (PDF); c) Disponibilização pelo Programa de Comutação Bibliográfica – Comut, do IBICT (Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia), órgão do Ministério de Ciência e Tecnologia.

Criciúma, 22 de Outubro de 2024

Assinatura: Momelo G. Rosa