

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**Kanandra Taisa Bertoncello**

**TAURINA PREVINE DÉFICIT NA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA  
EM UM NOVO MODELO DE BLACKOUT INDUZIDO POR ETANOL  
EM PEIXE-ZEBRA**

Santa Maria, RS  
2019

**Kanandra Taisa Bertoncello**

**TAURINA PREVINE DÉFICIT NA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA EM NOVO  
MODELO DE BLACKOUT INDUZIDO POR ETANOL EM PEIXE-ZEBRA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

Orientador: Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg

Santa Maria, RS  
2019

Bertoncello, Kanandra Taisa

TAURINA PREVINE DÉFICIT NA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA EM  
NOVO MODELO DE BLACKOUT INDUZIDO POR ETANOL EM PEIXE  
ZEBRA / Kanandra Taisa Bertoncello.- 2019.

53 p.; 30 cm

Orientador: Denis Broock Rosemberg

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica, RS, 2019

1. Esquiva Inibitória 2. Déficit Cognitivo 3. Etanol  
4. Taurina 5. Peixe-zebra I. Rosemberg, Denis Broock II.  
Título.

**Kanandra Taisa Bertoncello**

**TAURINA PREVINE DÉFICIT NA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA EM NOVO  
MODELO DE BLACKOUT INDUZIDO POR ETANOL EM PEIXE-ZEBRA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

**Aprovado em 18 de fevereiro de 2019:**



**Denis Broock Rosemberg, Dr. (UFSM)**  
Presidente/Orientador



**Maribel Antonello Rubin, Dra. (UFSM)**



**Angelo Luis Stapassoli Piato, Dr. (UFRGS)**

Santa Maria, RS  
2019

## **AGRADECIMENTOS**

Dedico este primeiro parágrafo ao meus pais Edel e Claudio, que são merecedores destes especiais agradecimentos, pois, sem eles eu não teria chegado até aqui. Agradeço por todo apoio que tive para que eu tivesse condições de estudar, pela ajuda para que esse meu objetivo fosse concluído, pelos incentivos e principalmente por todo amor que sempre foi imenso. Agradeço ao meu irmão Leonardo pelo carinho e por sempre me fazer rir. E meu obrigada à toda minha família pelo grande apoio e por sempre torcerem por mim.

Gostaria de agradecer à minha companheira Millena, que mesmo de longe sempre se fez presente em todos os momentos que passei durante o mestrado. Obrigada por ter sido meu porto seguro nos momentos difíceis, por todo carinho, paciência e amor. Agradeço a todas as amigas que mesmo a quilômetros de distância me apoiaram e compartilharam de suas palavras amigas. E também às amigas que pude cultivar em Santa Maria, pelos momentos que passamos e por tudo que aprendemos juntos.

Deixo meus agradecimentos ao meu orientador Denis, especialmente por me receber e abrir às portas do laboratório para mim. Agradeço por toda confiança em mim depositada, pelo conhecimento compartilhado e por oferecer ajuda em todos os momentos que foram necessários. Obrigada também aos meus colegas de laboratório que de uma forma ou outra sempre estavam presentes quando precisei.

Agradeço pelos momentos que passei durante o mestrado, que puderam contribuir para meu crescimento profissional e principalmente pessoal. Pelas pessoas que conheci, pelas experiências vivenciadas e por tudo que aprendi nessa fase da minha vida.

Por fim, agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro e à UFSM por disponibilizar todos os meios para que este trabalho fosse concluído.

*- Boa noite, meus amigos! – Disse Galadriel. – Durmam em paz! Esta noite, não sobrecarreguem seus corações pensando no melhor caminho. Pode ser que as trilhas nas quais cada um de vocês deve pisar já estejam diante de seus pés, embora talvez não consigam enxergá-las. Boa noite!*  
*(O Senhor dos Anéis – A Sociedade do Anel, p. 392, Martins Fontes)*

## RESUMO

### TAURINA PREVINE DÉFICIT NA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA EM NOVO MODELO DE BLACKOUT INDUZIDO POR ETANOL EM PEIXE-ZEBRA

AUTORA: Kanandra Taisa Bertoncello

ORIENTADOR: Dr. Denis Broock Rosemberg

A intoxicação e a dependência causadas pelo álcool estão entre os principais problemas de saúde pública e o abuso desta substância pode afetar órgãos e tecidos, bem como comprometer a coordenação física, percepção e cognição. A intoxicação alcoólica pode acarretar em déficits cognitivos, induzindo amnésia ou “blackout”, um defeito agudo na formação de novas memórias resultante de um rápido aumento de etanol no sangue. Devido aos aspectos negativos proporcionados pelo uso do álcool, buscam-se novas formas de prevenção contra os efeitos deletérios dessa droga. Assim, a taurina surge como um potencial alvo de estudo, pois é um aminoácido envolvido na modulação da atividade neuronal, transdução de sinais e osmorregulação, além de ser conhecida por suas propriedades antioxidantes e por antagonizar os efeitos neurotóxicos do glutamato. A fim de verificar um potencial efeito protetor da taurina sobre o déficit cognitivo induzido pelo etanol, utilizamos o aparato da esQUIVA INIBITÓRIA. Para atingir os objetivos, primeiramente padronizou-se uma frequência de choque específica que causa retenção significativa da memória no peixe-zebra. Posteriormente, verificamos se o etanol afeta a consolidação memória de forma dependente da concentração e se os pré-tratamentos com taurina previnem os déficits cognitivos induzidos pelo álcool. O aparato da esQUIVA INIBITÓRIA consiste em um aquário dividido em dois compartimentos de mesmo tamanho, sendo uma área escura e outra clara, as quais são separadas por uma divisória do tipo guilhotina. Três barras de metal paralelas são acopladas em cada lateral da área escura, conectadas a um estimulador elétrico. Diferenças na latência para entrar no compartimento escuro foram usadas como índices de retenção. Animais submetidos a um choque elétrico (125 mA,  $3 \pm 0,2$  V) de 10 e 1000 Hz não desenvolveram aprendizado significativo, enquanto 100 Hz proporcionou a retenção da memória, sendo esta frequência escolhida para experimentos subsequentes. Os tratamentos foram realizados imediatamente após a sessão de treino. Os animais foram expostos à água (controle), taurina (42, 150, 400 mg/L), etanol (0,25%, 1,0% v/v) ou taurina mais etanol, para avaliar os efeitos na consolidação da memória. A sessão de teste foi realizada 24 horas após o treino. O etanol na concentração de 0,25% não causou déficit cognitivo, mas 1,0% prejudicou a consolidação da memória sem alterar a locomoção. A administração pós-treino de MK-801 provocou uma resposta semelhante, sugerindo que a amnésia induzida por etanol pode ocorrer através da inibição da neurotransmissão glutamatérgica. Embora a taurina sozinha não tenha modulado o aprendizado, todas as concentrações testadas impediram o comprometimento da memória. Dessa maneira, o presente trabalho propõe um novo modelo de blackout induzido por etanol e demonstra o papel protetor da taurina, reforçando a utilidade crescente do peixe-zebra para avaliar os efeitos deletérios do álcool e possíveis estratégias terapêuticas.

**Palavras-chave:** blackout; taurina; cognição; esQUIVA INIBITÓRIA; etanol.

## ABSTRACT

### TAURINE PREVENTS MEMORY CONSOLIDATION DEFICITS IN A NEW MODEL OF ETHANOL-INDUCED BLACKOUT IN ZEBRAFISH

AUTHOR: Kanandra Taisa Bertoncello

ADVISOR: Dr. Denis Broock Rosemberg

Intoxication and dependence caused by alcohol are among the major public health problems. Alcohol abuse can affect organs and tissues, as well as compromise physical coordination, perception, and cognition. Alcohol intoxication may lead to cognitive deficits, such as amnesia or “blackout”, an acute defect in the formation of memories resulting from a rapid increase of ethanol in the blood. Due to the negative aspects of alcohol abuse, new therapeutic strategies are needed. Thus, taurine appears as a potential target since it modulates neuronal activity, transduction signaling pathways, osmoregulation, as well as displays antioxidant properties and antagonizes glutamatergic excitotoxicity. In order to verify a potential protective effect of taurine on the cognitive deficit induced by ethanol, we used the inhibitory avoidance task. A specific shock frequency that causes significant memory retention in zebrafish, was selected. Then, we verified if ethanol concentration-dependently affects the memory and tested whether taurine pretreatments counteract ethanol-induced cognitive deficits. The inhibitory avoidance apparatus was used to investigate the potential protective effects of taurine in a new model of ethanol-induced amnesia in zebrafish. The apparatus consists of an aquarium divided into two compartments of the same size, a dark and a bright area separated by a guillotine-like partition. Three parallel metal bars are attached to each side of the dark area, connected to an electrical stimulator. Differences on the latency to enter the dark compartment were used as retention indexes. Animals subjected to an electric shock (125 mA,  $3 \pm 0.2$  V) at 10 and 1000 Hz did not promote significant learning, while 100 Hz facilitated memory retention, which was chosen for subsequent experiments. Treatments were performed immediately after the training session. Animals were exposed to water (control), taurine (42, 150, 400 mg/L), ethanol (0.25%, 1.0% v/v) or taurine plus ethanol, to evaluate the effects on memory consolidation. Test session was performed 24 h following training. Ethanol at 0.25% did not cause cognitive deficit, but 1.0% ethanol impaired memory consolidation without altering locomotion. Posttraining administration of MK-801 elicited a similar response, suggesting that ethanol-induced amnesia may occur via inhibition of glutamatergic neurotransmission. Although taurine alone did not modulate learning, all concentrations tested prevented memory impairment. The present work proposes a new model of ethanol-induced blackout and demonstrates the protective role of taurine, reinforcing the growing utility of zebrafish to evaluate the deleterious effects of alcohol and possible therapeutic strategies.

**Keywords:** ethanol-induced amnesia; taurine; neuroprotection; inhibitory avoidance.



## LISTA DE ABREVIATURAS

ADH	Álcool desidrogenase
ALDH	Aldeído desidrogenase
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GABA <sub>A</sub>	Receptor ácido $\gamma$ -aminobutírico, subtipo A
NAD <sup>+</sup>	Nicotina adenina dinucleotídeo
NMDA	N-metil D-Aspartato
SLC6A6	Do inglês, 'Solute carrier, family 6, member 6'
SNC	Sistema nervoso central
TauT	Transportador de taurina
WHO	Do inglês, 'World Health Organization'

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribuição de doenças atribuíveis ao álcool.....	11
<b>Figura 2:</b> Etapas da formação da memória.....	14
<b>Figura 3:</b> Estrutura química da molécula da taurina.....	16
<b>Figura 4:</b> Representação do peixe-zebra fêmea (A), macho (B) e ciclo de vida da espécie (C).....	18

## SUMÁRIO

<b>1. APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
2.1 Etanol e seus efeitos nos sistemas biológicos .....	13
2.2 Aspectos relacionados à memória.....	15
2.3 Etanol e seus efeitos sobre a memória .....	16
2.4 Taurina e seus efeitos biológicos .....	17
2.5 Peixe-zebra como organismo modelo .....	18
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
3.1 Objetivo geral.....	20
3.2 Objetivos específicos .....	20
<b>4. MANUSCRITO CIENTÍFICO .....</b>	<b>21</b>
<b>5. CONCLUSÕES PARCIAIS.....</b>	<b>45</b>
<b>6. CONCLUSÃO FINAL .....</b>	<b>45</b>
<b>7. PERSPECTIVAS DO ESTUDO.....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>
<b>ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO CEUA/UFSM.....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO .....</b>	<b>53</b>

## 1. APRESENTAÇÃO

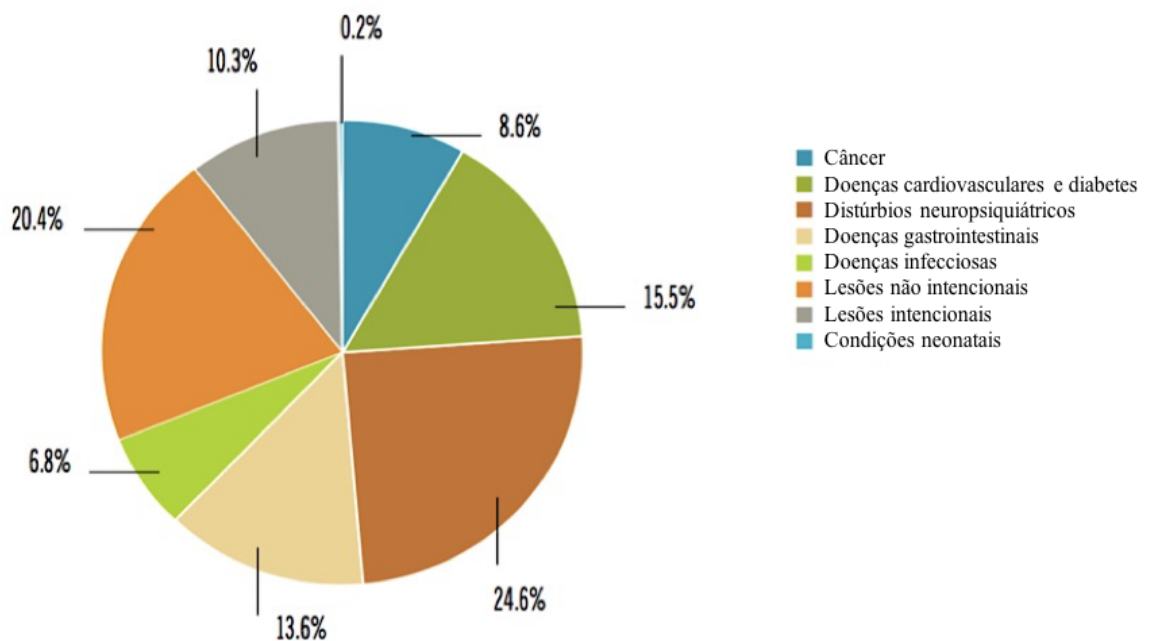
Esta dissertação estrutura-se da seguinte maneira: na **introdução** consta uma revisão bibliográfica sobre os itens abordados no trabalho e os **objetivos** do presente estudo. A seguir, os **materiais e métodos**, os **resultados e discussão** serão apresentados na forma de **manuscrito científico**. Na **conclusão**, discutirei os principais achados acerca do trabalho apresentado nesta dissertação. Por fim, as **perspectivas** trazem as possibilidades de estudos futuros a partir dos resultados obtidos. As **referências bibliográficas** referem-se às citações que aparecem na sessão introdução.

## 2. INTRODUÇÃO

### 2.1 Etanol e seus efeitos nos sistemas biológicos

O álcool é uma substância psicoativa capaz de causar dependência, o qual é caracterizado como um problema de saúde mundial (WHO, 2014). O consumo desta substância está relacionado a um conjunto de desfechos negativos à saúde, como morbidade, incapacidade funcional e mortalidade, podendo estar associado com mais de 200 doenças (HARPER, 2009; WHO, 2014; AMSTERDAM et al., 2015). Dentre essas patologias, os distúrbios neuropsiquiátricos destacam-se entre as principais doenças relacionadas ao abuso do álcool (**Figura 1**), principalmente por promover desequilíbrios fisiológicos, bioquímicos e neuroquímicos no sistema nervoso central (SNC) (QUERTEMONT, TAMBOUR & TIRELLI, 2005). A intoxicação e a dependência causadas pelo álcool estão entre os principais problemas de saúde pública e o abuso desta substância pode afetar órgãos e tecidos, bem como comprometer a coordenação física, percepção e cognição (WHO, 2014; CONTRERAS et al., 2017). Dessa maneira, o consumo excessivo do álcool tem sido relacionado com diversos danos fisiológicos (doenças cardíacas e hepatotoxicidade), prejuízo neurológico (alterações na memória, demência) e problemas sociais (déficits de convívio social) (RICO et al., 2007; ZORUSKI, MENNERICK & IZUMI, 2014).

**Figura 1** – Distribuição de doenças atribuíveis ao álcool.



Fonte: adaptado de WHO (2014).

Os efeitos do etanol apresentam uma resposta bifásica e dependente de dose, onde quantidades moderadas causam efeitos excitatórios e ansiolíticos, fatores que podem levar à dependência. Por outro lado, doses mais altas podem culminar na perda da coordenação motora, desorientação e sedação, caracterizando a fase depressora (CARLSON, 2001; SWIFT, 2003). A sensação inicial de relaxamento e alívio do estresse causada pelo etanol pode desencadear o comportamento de busca e o desenvolvimento do abuso do álcool, onde o consumo crônico pode levar à tolerância devido ao aumento do uso e conseqüentemente o vício (AMORIM, SILVA, LUCHIARI, 2017).

Em humanos, o etanol é principalmente absorvido pelo intestino delgado e 10% é absorvido pelo estômago (CEDERBAUM, 2012). A absorção começa após 10 minutos de consumo e o pico de etanol no sangue é alcançado entre 30 e 90 minutos. Aproximadamente 90% do etanol absorvido é metabolizado pelo fígado através da oxidação em uma média de 15 mg/dL por hora (JUNG & NAMKOONG, 2014). Dessa maneira, o consumo excedente faz com que o etanol seja acumulado no sangue, induzindo sintomas de intoxicação. Contudo, inúmeros fatores interferem na biodisponibilidade do etanol, como a presença de alimento no estômago, a quantidade de álcool consumida e sua farmacocinética (SWIFT, 2003).

A principal via responsável pelo metabolismo do etanol está associada a dois processos enzimáticos que requerem  $\text{NAD}^+$  como coenzima. A enzima álcool desidrogenase (ADH) é responsável por converter o etanol em acetaldeído, com a redução do  $\text{NAD}^+$ . Após, a aldeído desidrogenase (ALDH) metaboliza o acetaldeído a acetato, reduzindo o  $\text{NAD}^+$ . O acetato é posteriormente convertido em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CO}_2$  através do processo de oxidação aeróbica (SWIFT, 2003; CEDERBAUM, 2012). Além desta rota, o etanol pode ser degradado por meio de outras vias bioquímicas como o citocromo P450 (CYP2E1), que também pode oxidar o etanol no fígado (HIPÓLITO et al., 2007). O CYP2E1 é induzido pela consumo crônico e assume uma importante rota metabólica do etanol à acetaldeído em elevadas concentrações de álcool (ZAKHARI, 2006). Outra via de oxidação acontece pela ação da catalase, a qual é localizada nos peroxissomos e é capaz de oxidar o etanol na presença do sistema gerador de peróxido de hidrogênio, como o complexo enzimático NADPH oxidase ou a enzima xantina oxidase (MISRA et al. 1992). No fígado, a principal rota envolve a ADH e a ALDH, porém, no cérebro, a catalase desempenha um importante papel na degradação do etanol (SWIFT, 2003).

O consumo do álcool gera uma grande quantidade de acetaldeído, um metabólito altamente tóxico que reage com proteínas, fosfolipídios e ácidos nucleicos, participando ativamente da produção de espécies reativas de oxigênio (LANTMAN et al., 2017). Assim, o aumento de acetaldeído e o desbalanço celular do sistema redox podem estar relacionados a

alguns efeitos do consumo agudo de etanol como fadiga, dores de cabeça, aumento da sensibilidade à luz e som e alterações de humor (SWIFT & DAVIDSON, 1998). Dessa forma, a ingestão aguda do álcool está associada a consequências indesejadas, como a ressaca, onde os sintomas por trás dessa condição, como a apatia e déficits cognitivos, estão associados ao metabolismo do etanol (KIM et al., 2004).

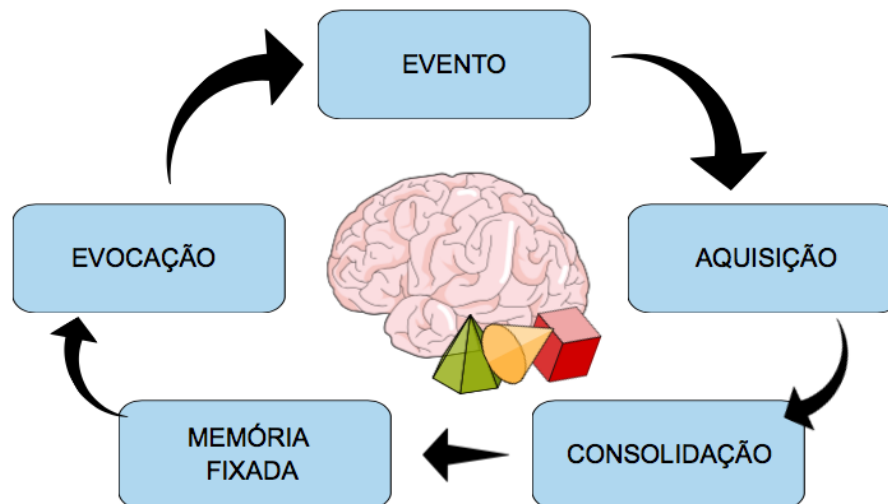
## 2.2 Aspectos relacionados à memória

A memória é a capacidade de codificar, armazenar, reter e recordar informações, caracterizada como uma função biológica fundamental para a sobrevivência dos indivíduos (KANDEL, 2006). Com base na sua duração, as memórias podem ser classificadas em curta e longa duração. Enquanto a memória de curto prazo é a capacidade de reter e recuperar informações por um curto período de tempo, geralmente por alguns segundos, as memórias de longo prazo armazenam informações para períodos de longa duração, às vezes por toda a vida (BISAZ, TRAVAGLIA & ALBERINI, 2014).

De um modo geral, o processo da formação da memória pode-se dividir em três etapas: a aquisição, a qual ocorre no momento de exposição à determinada experiência; a consolidação, momento instável e suscetível a modificações, reforçado pela repetição ou associação com informações já armazenadas; e evocação, momento de recordação da memória (MOURÃO JUNIOR & FARIA, 2015). Em outras palavras, o indivíduo experimenta um evento, onde alguns aspectos deste momento são codificados, essa codificação inicia uma série de processos, tipicamente rotulados como “consolidação”, que levam tempo, levando à memória permanente (**Figura 2**). A consolidação de memória desempenha um papel fundamental nessa sequência, pois determina o que será preservado após a codificação inicial e quanto tempo esse processo leva (NADEL et al., 2012).

Neste sentido, o abuso de substâncias psicoativas pode afetar processos de aprendizagem e memória devido alterações neurofisiológicas que induzem déficits cognitivos (VIK et al., 2004). As regiões cerebrais e os processos subjacentes ao abuso de drogas se sobrepõem aos que estão envolvidos em funções cognitivas essenciais, como aprendizagem, memória, atenção, raciocínio e controle de impulsos (GOULD, 2010). Estudos de neuroimagem demonstram que usuários de substâncias psicoativas sofrem prejuízos neurológicos significativos, apresentando alterações funcionais e estruturais em várias regiões cerebrais, tais como regiões mesocorticais e mesolímbicas (VOLKOW & LI, 2005; YUCEL et al., 2007).

**Figura 2** – Etapas da formação da memória.



Fonte: do autor. Recursos mindthegraph.com.

### 2.3 Etanol e seus efeitos sobre a memória

O abuso de álcool está associado a comorbidades médicas que afetam o SNC, e dentre os principais efeitos adversos podemos destacar a disfunção cognitiva de curto e longo prazo (ZORUMSKI, MENNERICK & IZUMI, 2014). Um dos problemas relacionados à intoxicação pelo álcool é a amnésia temporária, também chamada de “blackout”, onde o indivíduo é incapaz de recordar tudo ou partes de um determinado evento ocorrido em um episódio de intoxicação, ou seja, é um defeito agudo na formação de novas memórias (WHITE, MATTHEWS & BEST, 2000). A amnésia alcoólica resulta de um rápido aumento de etanol no sangue bloqueando a consolidação de memórias de curto prazo, processo que envolve o hipocampo e estrutura medial temporal em mamíferos (MILLER & MATZEL, 2000). Pessoas intoxicadas têm memórias remotas relativamente intactas, mas são incapazes de recordar eventos que aconteceram minutos antes (JUNG & NANKOONG, 2014). Em contrapartida, o abuso crônico do etanol está associado a danos permanentes na memória e cognição, referido como “demência alcoólica” (AMSTERDAM et al., 2015).

O etanol é uma droga psicoativa depressora do SNC e essa propriedade está associada com sua ação modulatória sobre diferentes neurotransmissores. Por exemplo, o consumo de etanol em doses mais elevadas leva à estimulação dos receptores GABAérgicos e à inibição dos receptores glutamatérgicos (WHITE, MATTHEWS & BEST, 2000). Assim, o consumo de álcool a curto prazo debilita as funções cerebrais por causar uma alteração no balanço entre a



neurotransmissão inibitória e excitatória (COSTARDI et al., 2015). Esse desbalanço resultante dos efeitos do etanol pode acarretar em alterações neurais e manifestações comportamentais como a diminuição da atenção, e prejuízos na memória e no humor (ZORUMSKI, MENNERICK & IZUMI, 2014).

Estudos demonstraram que a exposição ao etanol a curto prazo inibe os receptores de glutamato e potencializa a transmissão inibitória de GABA no hipocampo de mamíferos, acarretando em disfunção sináptica (LOVINGER et al., 1990; PARK et al., 2016). Além disso, altas concentrações de etanol inibem seletivamente a corrente iônica ativada pela aplicação do agonista do receptor de glutamato, N-metil D-Aspartato (NMDA), sugerindo que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos possam contribuir com os danos cognitivos e sobre a função neural associados à intoxicação pelo álcool (LOVINGER, WHITE & WEIGHT, 1990; LOVINGER & ROBERTO, 2013). A exposição aguda ao etanol também inibe o influxo de cálcio através dos receptores de NMDA e altera a sinalização dependente do cálcio, podendo afetar a plasticidade sináptica mediada por receptores glutamatérgicos no cérebro, contribuindo com danos cognitivos (CHANDLER, 2003). Tendo em vista os aspectos negativos proporcionados pelo uso do álcool, buscaram-se novas formas de prevenção contra os efeitos deletérios dessa droga.

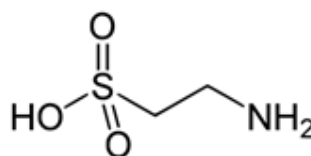
#### **2.4 Taurina e seus efeitos biológicos**

A taurina (ácido 2-amino-etanossulfônico,  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ ) é um aminoácido abundante em vários tecidos caracterizados por um alto metabolismo oxidativo, como no encéfalo e músculo esquelético (HUXTABLE, 1992). Esta molécula difere dos demais aminoácidos por possuir ácido sulfônico ao invés do ácido carboxílico em sua estrutura química (HUXTABLE, 1992; MEZZOMO et al., 2018) (**Figura 3**). Nos humanos, as concentrações intracelulares de taurina variam entre 5 e 20  $\mu\text{mol/g}$  em diversos tecidos como músculo cardíaco, retina, músculo esquelético e encéfalo (ROSEMBERG et al., 2010). A taurina é sintetizada endogenamente através da oxidação sequencial da cisteína em ácido cisteína sulfínico, catalisada pela cisteína dioxigenase, descarboxilação da cisteína sulfinato descarboxilase, e oxidação da hipotaurina em taurina através da hipotaurina desidrogenase (VITVITSKI, GARG & BANERJEE, 2011). A captação da taurina em células de vertebrados é mediada por um transportador específico, denominado TauT (SLC6A6) que é responsável pela regulação dos níveis de taurina utilizando-se dos gradientes de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (ROSEMBERG et al., 2010; BANERJEE et al., 2013). A molécula da taurina está envolvida na modulação da

atividade neuronal (WU & PRENTICE, 2010), transdução de sinais (WU et al., 2005), na osmorregulação (SCHAFFER et al., 2010), além de ser conhecida por suas propriedades antioxidantes (CHAN et al., 2014).

Com relação aos efeitos sobre o SNC, a taurina estimula os neurônios GABAérgicos pela ação agonista em receptores GABA<sub>A</sub>, o que antagoniza os efeitos neurotóxicos do glutamato (OJA & SARANSAARI, 2013; CURRAN & MARCZINSKI, 2017). Dessa forma, estudos têm demonstrado a capacidade da taurina em proteger os neurônios da excitotoxicidade do glutamato através da diminuição do Ca<sup>2+</sup> livre (SAMUELSSON et al., 2013). As propriedades antioxidantes desta molécula agem de maneira neuroprotetora e neuromoduladora, importantes para o desenvolvimento e regeneração do SNC (CHAN et al., 2014). Além disso, acredita-se que seu potencial neuroprotetor também esteja associado com a ativação do influxo de Cl<sup>-</sup> ou pela redução dos níveis de cálcio intracelulares (BANERJEE et al., 2013). Devido às ações pleiotrópicas da taurina em vertebrados, a caracterização de modelos animais alternativos para investigar seus efeitos neurobiológicos evolutivamente conservados torna-se relevante.

**Figura 2** - Estrutura química da molécula da taurina.



Fonte: RIPPS & SHEN (2012).

## 2.5 Peixe-zebra como organismo modelo

O peixe-zebra (*Danio rerio*), conhecido popularmente como paulistinha, é um pequeno teleosteo da família Cyprinidae que apresenta listras horizontais escuras nas laterais do corpo e rápido desenvolvimento até a fase adulta (SCHILLING, 2002) (**Figura 4**). Esse peixe é um organismo modelo adequado para avaliar os efeitos biológicos de substâncias que modulam a função cerebral em vertebrados (FONTANA et al., 2018; MEZZOMO et al., 2018). A espécie tem um genoma evolutivamente conservado quando comparado ao de humanos, possui comportamentos bem caracterizados e uma alta sensibilidade a manipulações farmacológicas, permitindo o desenvolvimento de modelos em pesquisas da neurociência translacional (HOWE et al., 2013; KALUEFF et al., 2013; STEWART et al., 2014). Além disso, de acordo com

análises neuroatômicas e respostas eletrofisiológicas, o telencéfalo dos peixes teleósteos contém uma estrutura de função similar ao hipocampo dos mamíferos, a qual pode estar associada às condições de memória e aprendizagem (BRAFOR, 1995). Estudos demonstram que o peixe-zebra pode aprender a associação entre estímulos aversivos de diferentes naturezas (PATHER & GERLAI, 2009; MAXIMINO et al., 2018), associação entre espaço e recompensa (WILLIAMS, WHITE & MESSER, 2002) e condicionamento olfativo (BRAUBACH et al., 2009), permitindo a avaliação de mecanismos neurais básicos associados à aprendizagem e memória.

A maioria dos efeitos causados pelo etanol no comportamento de peixe-zebra já se encontram caracterizados, sendo que esta substância também provoca um efeito bifásico na atividade locomotora do peixe (GERLAI et al., 2000; ROSEMBERG et al., 2012), bem como modula o comportamento social (GERLAI et al., 2009; BUSKE & GERLAI, 2011; MULLER et al., 2017) e aumenta a agressividade (GERLAI et al., 2000). Além disso, a proteína TauT do peixe-zebra possui 625 aminoácidos e apresenta uma similaridade molecular de cerca de 73% em comparação com o humano (MEZZOMO et al., 2016). Dados comportamentais mostram que peixes-zebra expostos de forma aguda a taurina nas concentrações de 42, 150 e 400 mg/L apresentam um perfil tipo-ansiolítico sem mudanças na locomoção (MEZZOMO et al., 2016; FONTANA et al., 2018).

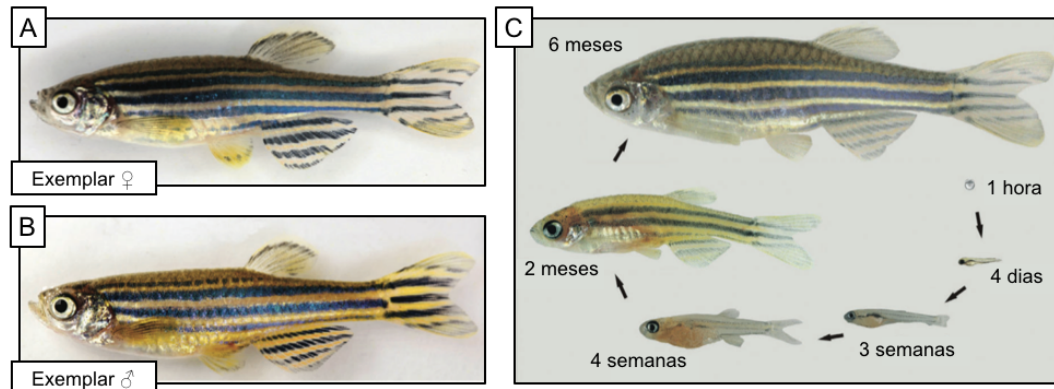
Estudos já demonstraram o papel protetor da taurina diante a exposição aguda ao etanol onde o pré-tratamento previne o aumento da atividade da acetilcolinesterase e a peroxidação lipídica no encéfalo do peixe-zebra (ROSEMBERG et al., 2010). Dessa forma, a taurina exerce efeitos neuroprotetores e antioxidantes neste organismo modelo, o qual foi recentemente sugerido como uma espécie atrativa para estudos relacionados às ações pleiotrópicas da taurina e ao potencial papel neuroprotetor desta molécula em diferentes modelos experimentais (MEZZOMO et al., 2018).

Uma das principais vantagens de se utilizar o peixe-zebra em estudos de abuso do etanol e demais substâncias, está relacionada ao método como a droga é administrada, onde os animais são imersos em compostos solúveis que podem ser facilmente dissolvidos na água do aquário e absorvidos através da pele e brânquias, compondo um método não invasivo (TRAN, FACCIOL & GERLAI, 2016). Além disso, os efeitos comportamentais da exposição aguda e crônica ao etanol já são bem caracterizados em peixe-zebra (GERLAI et al., 2000; CAMPBELL et al., 2006; GERLAI et al., 2009; BUSKE & GERLAI, 2011; PARKER et al., 2012), o que permite explorar os potenciais efeitos da taurina sobre o déficit cognitivo induzido pelo etanol.

Assim, considerando as consequências causadas pelo uso do álcool, o qual é capaz de

prejudicar funções cognitivas, e o fato da taurina possuir propriedades neuroprotetoras, a exposição a esta molécula pode contribuir na investigação de estratégias alternativas para auxiliar na prevenção dos efeitos negativos do etanol sobre o processo de consolidação da memória.

**Figura 4** - Representação do peixe-zebra fêmea (A), macho (B) e ciclo de vida da espécie (C).



Fonte: adaptado de NUSSLEIN-VOLHARD & SINGH (2017).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da taurina sobre o déficit na consolidação da memória induzido pela exposição aguda ao etanol.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Padronizar as condições para a indução do estímulo que gera memória aversiva em peixes-zebra submetidos a um aparato de esquiva inibitória;
- Validar farmacologicamente o aparato através da verificação do desempenho em peixes submetidos a déficit cognitivo induzido por MK-801;
- Avaliar os efeitos da exposição aguda ao etanol no processo de consolidação da memória;
- Verificar a influência da taurina no processo de consolidação da memória, bem como de seu pré-tratamento no déficit da consolidação da memória induzido pelo etanol;
- Investigar a influência da locomoção nas respostas promovidas pela taurina e pelo etanol.

#### 4. MANUSCRITO CIENTÍFICO

### **Taurine prevents memory consolidation deficits in a novel alcohol-induced blackout model in zebrafish**

Kanandra T. Bertoncello, Talise E. Müller, Barbara D. Fontana, Francini Franscescon, Gilvan  
L. B. Filho and Denis B. Rosemberg

O manuscrito apresenta-se na forma ao qual foi submetido ao periódico *Progress in  
Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*.

## Taurine prevents memory consolidation deficits in a novel alcohol-induced blackout model in zebrafish

Kanandra T. Bertoncello<sup>a,b,\*</sup>, Talise E. Müller<sup>a,b</sup>, Barbara D. Fontana<sup>a,b</sup>, Francini Franscescon<sup>a,b</sup>, Gilvan L. B. Filho<sup>d</sup> and Denis B. Rosemberg<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratory of Experimental Neuropsychobiology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Natural and Exact Sciences Center, Federal University of Santa Maria, 1000 Roraima Avenue, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.*

<sup>b</sup> *Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria. 1000 Roraima Avenue, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.*

<sup>c</sup> *The International Zebrafish Neuroscience Research Consortium (ZNRC), 309 Palmer Court, Slidell, LA 70458, USA.*

<sup>d</sup> *Department of Biomedical Equipment. Federal Institute of Education, Science and Technology. s/n BR 406, Km 145. Ceará-Mirim, RN, 59570-000, Brazil.*

\*Correspondence to:

### **Denis B. Rosemberg**

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Natural and Exact Sciences Center, Federal University of Santa Maria. 1000 Roraima Avenue, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

E-mail: dbrosemberg@gmail.com

### **Kanandra T. Bertoncello**

Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria. 1000 Roraima Avenue, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

E-mail: kanandratb@gmail.com

## Highlights

- We describe a novel ethanol-induced blackout model in zebrafish.
- Different shock frequencies modulate inhibitory avoidance response.
- Similar to MK-801, high ethanol concentration impairs memory consolidation.
- Taurine exerts a protective role by preventing ethanol-induced amnesia.
- Ethanol and taurine do not alter motor coordination 24 h after exposure.

## Abstract

Ethanol is one of the most consumed substance worldwide that impairs learning and memory processes, resulting in amnesia or "blackout". Taurine is an abundant amino sulfonic acid in excitable tissues that counteracts excitotoxicity. Here, we used an inhibitory avoidance apparatus to investigate the potential preventive effects of taurine in a novel ethanol-induced amnesia model in zebrafish. The experimental tank consisted of two compartments of the same size, one dark and another bright, which were separated by a guillotine-type door. Three parallel metal bars coupled to an electrical stimulator were connected on each lateral wall of the dark compartment as electrical stimulus source. Differences on the latency to enter the dark compartment were used as retention indexes. A mild electric shock (125 mA,  $3 \pm 0.2$  V) at 10 and 1000 Hz did not promote significant learning, while 100 Hz facilitated memory retention, which was chosen for subsequent experiments. Treatments were performed immediately after the training session. Animals were exposed to water (control), taurine (42, 150, 400 mg/L), ethanol (0.25%, 1.0% v/v) or taurine plus ethanol to assess the effects on memory consolidation. Test session was performed 24 h following training. Ethanol at 0.25% did not affect memory consolidation, but 1.0% ethanol impaired memory without changing locomotion. Posttraining administration of MK-801 elicited a similar response, suggesting that ethanol-induced amnesia may occur via inhibition of glutamatergic neurotransmission. Although taurine alone did not modulate learning, all taurine concentrations tested prevented ethanol-induced memory impairment. Overall, we describe a novel ethanol-induced blackout model, where a high ethanol concentration acutely impairs memory consolidation in zebrafish. Moreover, since taurine showed a protective role, we reinforce the growing utility of zebrafish models for assessing the deleterious effects of alcohol and potential therapeutic strategies.

**Keywords:** Ethanol-induced amnesia; neuroprotection; zebrafish; inhibitory avoidance.



## 1. Introduction

The abuse of psychoactive drugs can affect learning and memory processes due to neurophysiological changes that induce cognitive impairments (Vik et al., 2004). Ethanol is a substance widely consumed worldwide that promotes cognitive dysfunction at higher doses, causing temporary amnesia or “blackout” (Lee et al., 2009). This phenomenon results from an acute defect of memory formation, where individuals are unable to remember episodes that occurred following intoxication (White et al., 2000). In mammals, alcohol-induced blackout results from a rapid increase of ethanol levels in the blood that reach the brain and impair memory consolidation, which involves the hippocampus and temporal medial structure (Miller and Matzel, 2000). Alcoholic individuals are more susceptible to develop neurological disorders associated with severe cognitive dysfunction, as alcohol-associated dementia and Wernicke-Korsakoff syndrome, for example (de la Monte and Kril, 2014; Parsons and Nixon, 1993).

Ethanol displays a dose-dependent response, where low doses induce anxiolytic effects and higher doses culminate in loss of motor coordination, disorientation, and sedation, characterizing the depressant phase mainly due to the stimulation of GABAergic receptors (Tran and Gerlai, 2013; White et al., 2000). Moreover, high ethanol doses selectively inhibit the ionic current activated by the application of the glutamate receptor agonist, N-methyl D-Aspartate (NMDA) (Lovinger et al., 1990). Thus, short-term alcohol consumption debilitates brain functions by changing inhibitory and excitatory neurotransmission pathways (Costardi et al., 2015). The antagonism of NMDA receptors following alcohol abuse results in decreased attention, as well as impaired memory and mood (Zorumski et al., 2014), thereby contributing to ethanol-induced cognitive damages (Lovinger and Roberto, 2013). Because ethanol has deleterious effects on brain functions that result in various behavioral changes, such as memory impairments, the searching for the neurobiological mechanisms underlying these responses, as well as therapeutic strategies, are relevant.

Taurine is an amino acid abundantly found in several tissues, such as brain, retina, skeletal muscle, and cardiac muscle (Huxtable, 1992). In humans, intracellular taurine concentrations range from 5 to 20  $\mu\text{mol/g}$  (Mezzomo et al., 2018). This molecule is synthesized endogenously via sequential oxidation reactions of cysteine, where the cysteine sulfinatase is the rate-limiting enzyme (Vitvitsky et al., 2011). Extracellular taurine concentrations are regulated by a specific transporter (TauT), which uses transmembrane gradients levels of  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  (Banerjee et al., 2013; Mezzomo et al., 2018; Rosemberg et al., 2010). Taurine modulates neuronal activity (Wu and Prentice, 2010),  $\text{Ca}^{2+}$  metabolism (Foos and Wu, 2002), transduction signaling pathways (Wu et al., 2005), osmoregulation (Schaffer et al., 2010), as well as displays antioxidant properties (Chan et al., 2014; Rosemberg et al., 2010). In the central nervous system (CNS), taurine acts as a  $\text{GABA}_A$  receptor agonist and decreases  $\text{Ca}^{2+}$  influx, counteracting glutamatergic excitotoxicity (Curran and Marczynski, 2017; Oja and Saransaari, 2013; Samuelsson et al., 2013).

The zebrafish (*Danio rerio*) is a suitable model organism to assess the biological effects of substances that modulate brain function in vertebrates (Fontana et al., 2018; Mezzomo et al., 2018). This species has an evolutionarily conserved genome when compared with the human counterpart, well-characterized behaviors, and a high sensitivity to pharmacological manipulations, allowing the developing of zebrafish models in translational neuroscience research (Howe et al., 2013; Kalueff et al., 2013; Stewart et al., 2014). Despite their simpler CNS organization, the telencephalon of teleost fish is analogous to the mammalian hippocampus, which is involved with cognitive processes (Braford, 1995). Zebrafish respond to aversive stimuli of different natures (Maximino et al., 2018; Pather and Gerlai, 2009), as well as associate space and reward (Williams et al., 2002), allowing the assessment of basic neural mechanisms underlying learning and memory. Importantly, ethanol also elicits a biphasic effect on locomotor activity of zebrafish (Gerlai et al., 2000; Rosemberg et al., 2012), modulates social behavior

(Buske and Gerlai, 2011; Gerlai et al., 2009; Muller et al., 2017), and increases aggression (Gerlai et al., 2000). Here, we hypothesize that taurine prevents ethanol-induced blackout using an inhibitory avoidance protocol. To achieve our goal, we first selected a specific shock frequency that causes a significant memory retention in zebrafish. Then, we verified if ethanol concentration-dependently affects the memory and tested whether taurine pretreatments counteract ethanol-induced cognitive deficits in this aquatic species.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Animals*

Wild-type adult zebrafish (3–5 months old, ~ 50:50 male:female ratio) were obtained from a local supplier (Hobby Aquários, RS, Brazil). Animals were kept in 40 L tanks (density of four fish per liter) filled with non-chlorinated water under constant filtration and aeration. Water temperature, pH, and conductivity were set at  $27 \pm 1$  °C, 7.0–7.2, and 1,500–1,600  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , respectively. Fish were acclimated for three weeks before the experiments under a 14h/10h light/dark photoperiod (lights on at 7:00 am and off at 9:00 pm) and fed with a commercial fish food (Alcon BASIC®, Alcon, Brazil) twice daily. All procedures were previously approved by Ethics Commission on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (process number 026/2014).

Before the experiments, animals were acclimated for 3 days in partitioned Plexiglas tanks (50 cm x 35 cm x 6 cm – length x width x height), which had equal divisions for each fish (6 cm X 6 cm X 6 cm – length X width X height). These tanks had small perforations (0.5 cm diameter) allowing free water circulation and visual contact among fish, minimizing isolation stress (Maximino et al., 2018; Ziani et al., 2018). Importantly, this strategy allowed a precise identification of the individuals across trials. Animals were fed normally during the period and all experiments were performed using two independent fish batches.

## 2.2. Experimental design

### 2.2.1. Inhibitory avoidance

Inhibitory avoidance was performed based on the protocols described elsewhere (Blank et al., 2009; Manuel et al., 2014; Ng et al., 2012). The apparatus consisted of a glass tank (30 cm length x 10 cm width x 10 cm high) filled with 1.3 L of non-chlorinated water. The tank was divided into two equally sided black and white compartments separated by a manually operated opaque guillotine-type partition (10 cm x 10 cm). The black chamber contained three pairs of stain steel metal bars (1 cm diameter) spaced 5 cm within bars, connected to a 12 V stimulator. Each pair of bars was adjusted to allow the formation of an electrical dipole, inverting polarity after each electric stimulus. Initially, shock frequencies were set at 10 Hz (5 pulses of 50 ms every 500 ms), 100 Hz (50 pulses of 5 ms every 500 ms), and 1000 Hz (500 pulses of 0.5 ms every 500 ms). Thus, a similar period of shock was applied in all frequencies per second. Since no stimulus frequency has been described for zebrafish inhibitory avoidance devices, we used frequencies commonly employed in electric stimulation machines for physiotherapy proposes (10–100 Hz), as well as those described for rodent apparatuses (Borba Filho et al., 2015; Garin-Aguilar et al., 2014; Lloyd et al., 1986).

At the training session, zebrafish were individually placed on the bright side of the tank. After 1 min acclimatization, the guillotine door was lifted, allowing fish to enter the dark compartment. When fish crossed to the black side of the tank, the sliding partition was closed and a mild electric shock (125 mA,  $3 \pm 0.2$  V AC - intensity measured between the steel bars and the center of the black compartment) was administered for 5 s. Later, fish were gently removed from the apparatus and placed in their respective perforated housing tanks. Memory retention was assessed after 24 h similarly to the training session, except that no shock was administered. Differences in the latency to enter the black side of the tank (recorded to a maximum of 300 s) in test and training sessions were used as indexes of retention. Additional

controls were performed to ensure learned association between shock and crossings to the dark compartment, in which animals were submitted to the same procedures, but did not receive electric shock while remained 5 s in the black side of the tank at the training session.

### *2.2.2. Treatments*

To test the predictive validity of the model, we investigated the effects of MK-801, a non-competitive antagonist of the NMDA receptor, which evolutionarily impairs memory formation in various organisms, including zebrafish (Blank et al., 2009; Ng et al., 2012). Immediately after the training session, animals were briefly cold-anesthetized and saline solution (PBS) or 2.0 mg/kg MK-801 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (Herculano et al., 2015) were then injected intraperitoneally using a BD Ultra-fine™ 30U syringe (needle size 6 mm x 0.25 mm) with a maximum volume of 10 µL (which does not impair zebrafish behaviors) (Kinkel et al., 2010).

To assess the influence of taurine and ethanol on memory consolidation, the exposure protocol consisted of two consecutive 1 h periods after the training session. Animals were initially exposed to water or taurine (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) at the concentrations of 42, 150, or 400 mg/L (T42, T150 and T400 groups, respectively) for 60 min (Rosemberg et al., 2012; Rosemberg et al., 2010). Then, fish were later exposed to water or ethanol (Merck, Darmstadt, Germany) at 0.25% (v/v) or 1.0% (v/v) (E0.25 and E1.0 groups, respectively) for 60 min. These ethanol concentrations were selected because they induce anxiolytic-like responses and depressant-like effects in zebrafish, respectively (Gerlai et al., 2000). For each treatment, zebrafish were individually exposed in 500 mL beakers in the absence or presence of drugs as described elsewhere (Rosemberg et al., 2012). **Fig. 1** shows the experimental protocol with following groups were tested: i) Control group (water + water) ii) Taurine groups (taurine + water); iii) Ethanol groups (water + ethanol); iv) taurine-pretreated groups (taurine +

ethanol). Control group was handled in a similar manner, except that no drug was added in the water.

### *2.2.3. Locomotor activity measurement*

Locomotor activity of zebrafish was evaluated 24 h after the training session. Briefly, animals were individually placed in a rectangular tank (25 cm length × 15 cm height × 6 cm width) filled with 1.5 L of water and their swimming behavior was recorded for 6 min. We measured the following endpoints: time immobile, absolute turn angle, and maximum speed. Data were extracted from automated video-tracking software, which recorded fish activity at 30 frames/s (ANY-Maze, Stoelting, CO) (Rosemberg et al., 2012).

### *2.3. Statistics*

Normality of data and homogeneity of variances were analyzed by Kolmogorov–Smirnov and Bartlett's tests, respectively. Nonparametric data of latencies to enter the dark area in training and test sessions were expressed as median ± interquartile range and analyzed by Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Retention indexes were expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M.) and further analyzed by unpaired Student's *t* test (effects of MK-801 on memory consolidation), one-way analyses of variances followed by Dunnet's post-hoc test (effects of shock frequencies and ethanol) or by two-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test (effects of taurine and ethanol). The level of significance was set at  $p \leq 0.05$ .

## **3. Results**

### *3.1. Effects of shock frequencies and MK-801 on inhibitory avoidance*

**Figure 2** shows the effects of different shock frequencies (10 Hz, 100 Hz, and 1000 Hz)

and the influence of MK-801 on memory formation. Wilcoxon matched-pairs signed rank test revealed that 100 Hz group showed increased latency to enter the dark compartment in test session ( $W = 36.00$ ;  $p = 0.0078$ ). Moreover, the absence of electric shock did not affect the latency to enter in the dark area when animals were retested (**Fig. 2A**). One-way ANOVA revealed significant differences in the retention index, where fish that receive a 100 Hz shock spent more time to enter the dark compartment when compared with animals that did not receive shock ( $F_{(3, 39)} = 2.927$ ;  $p = 0.0456$ ) (**Fig. 2B**). Thus, the frequency of 100 Hz was chosen for subsequent experiments. Additionally, MK-801 impaired memory consolidation ( $W = 53.00$ ;  $p = 0.0039$ ) (**Fig. 2C**), where a significant reduction on the retention index was observed when compared to the control group ( $t_{(21, 0.05)} = 2.127$ ;  $p = 0.0227$ ) (**Fig. 2D**).

### 3.2. High ethanol concentration impairs memory consolidation

**Figure 3** demonstrates the effects of 0.25% and 1.0% ethanol on memory consolidation. Wilcoxon matched-pairs signed rank test indicated that both control ( $W = 89.00$ ;  $p = 0.0005$ ) and E0.25 ( $W = 53.00$ ;  $p = 0.0039$ ) groups showed memory retention on test session. Conversely, the latencies to enter the dark compartment between training and test sessions did not differ in E1.0 group (**Fig. 3A**). One-way ANOVA revealed significant differences in the retention index, with a reduced performance of E1.0 group in the test session ( $F_{(2, 26)} = 9.466$ ;  $p = 0.0005$ ) (**Fig. 3B**), when compared to control. Thus, 1.0% ethanol was selected to assess the potential protective role of taurine on ethanol-induced blackout in zebrafish.

### 3.3. Taurine prevents ethanol-induced blackout

**Figure 4** shows the effects of taurine pretreatment on memory consolidation. Wilcoxon test comparison indicated that control ( $W = 36.00$ ;  $p = 0.0078$ ), taurine 42, 150, and 400 groups ( $W = 64.00$ ;  $p = 0.0093$ ,  $W = 54.00$ ;  $p = 0.0137$ , and  $W = 49.00$ ;  $p = 0.0098$ , respectively), and taurine

42, 150, and 400 pretreatment groups ( $W = 45.00$ ;  $p = 0.0039$ ,  $W = 66.00$ ;  $p = 0.0010$  and  $W = 55.00$ ;  $p = 0.0020$ , respectively) showed a significant memory retention 24 h after the training session (**Fig. 4A**). Moreover, a two-way ANOVA showed a significant taurine x ethanol interaction for the retention index ( $F_{(3, 78)} = 4.203$ ;  $p = 0.0082$ ) (**Fig. 4B**). Although taurine alone did not alter memory when compared to control, taurine pretreatment prevented ethanol-induced amnesia.

#### *3.4. Ethanol and taurine do not affect locomotion 24 h after training session*

**Figure 5** shows the influence of each treatment on locomotion-related endpoints 24 h following the training session. Two-way ANOVA showed that taurine and ethanol did not change the time immobile, maximum speed, and absolute turn angle when compared to control.

## **4. Discussion**

Here, we demonstrate a protective role of taurine against the deleterious effects of ethanol in a novel alcohol-induced blackout model in zebrafish. To our knowledge, we describe the first evidence of how different shock frequencies affect the inhibitory avoidance response in this aquatic species, showing a robust memory retention following a mild electric shock at 100 Hz. Similar to MK-801, 1.0% ethanol acutely impaired memory consolidation, suggesting that a high alcohol concentration elicits alcohol-induced amnesia in zebrafish. Moreover, taurine prevented the effects of ethanol on inhibitory avoidance learning without changing locomotion, which reinforces its beneficial roles in the CNS.

In the inhibitory avoidance apparatus, electrical conduction depends on “extrinsic factors” in addition to the bioimpedance (*e.g.*, water conditions and shock frequency), which has received little attention in the literature so far. Even using a battery as electric source, the stimulus should be given in form of pulses since the constant current may promote fixed muscle contraction



thereby burning the skin (Borba Filho et al., 2015). To verify the effects of the stimulus frequency on the inhibitory avoidance response, we first tested how different shock frequencies (10, 100, and 1000 Hz) influence learning. Although 10 Hz slightly improved memory retention when compared to animals tested in the absence of shock, 100 Hz promoted a significant learning 24 h after training session. Importantly, we observed an inverted U-shaped response, where 1000 Hz reduced behavioral performance in the task. In rodents, the frequency of the applied current plays a key role in a step-down inhibitory avoidance response, where 0.35 mA and 0.5 mA at 62 and 125 Hz, but not at 20 Hz, promote significant learning (Borba Filho et al., 2015). Evidence also shows that different experimental set ups may influence learning and memory in the inhibitory avoidance behavior of Mongolian gerbil (Hurtado-Parrado et al., 2017) and high-frequency stimulation of the hippocampus blocks fear learning sensitization in rats (Deschaux et al., 2015). Thus, the use of an appropriate frequency facilitates memory retention in zebrafish and the 100 Hz shock frequency was selected for subsequent experiments. Additionally, testing high shock frequencies is unnecessary for reproducing reliable aversive conditioning effects in this aquatic species, since they may impair learning performance.

High ethanol concentrations acutely promote synaptic dysfunction through blockade of glutamate receptors and potentiation of GABA inhibitory transmission (Zorumski et al., 2014). Moreover, ethanol selectively inhibits the NMDA-induced ionic currents, suggesting that blockade of glutamatergic receptors may contribute to its deleterious effects on long-term potentiation (Lovinger et al., 1990). Here, we observed that 1.0% ethanol, which has been shown to induce sedative-like effects in zebrafish by affecting motor coordination (Gerlai et al., 2000; Rosemberg et al., 2012), impaired memory consolidation since animals showed similar latencies to enter the dark compartment in both training and test sessions. Similarly, MK-801 impaired memory formation when given immediately after training. Although the mechanisms underlying alcohol-mediated responses in zebrafish still require further scrutiny, the antagonism of NMDA

receptors may play a role, at least partially, with the ethanol-induced blackout reported here. When 0.5% ethanol is administered before or during the training session, fish show a significant learning performance in the inhibitory avoidance task, while chronic ethanol exposure and withdrawal impair memory (Amorim et al., 2017). Because 0.25% ethanol did not alter memory performance in the inhibitory avoidance task, our data reflect a concentration-dependent effect of alcohol on memory formation in zebrafish.

Evidence shows pleiotropic effects of taurine in the CNS by modulating calcium homeostasis, protein phosphorylation, and ion channels (Oja and Saransaari, 2013). Furthermore, taurine has antioxidant properties and acts as a GABA<sub>A</sub> receptor agonist, playing a key role on inhibitory neuromodulation (Curran and Marczynski, 2017). When administered for 10 or 30 days, taurine alone does not modulate memory retention in rats (Vohra and Hui, 2000). However, this molecule has beneficial effects when associated with amnesia-inducing agents (*e.g.*, kainic acid and ethanol), as well as reverses alcohol-induced motor impairments (Vohra and Hui, 2000). Likewise, we verified that taurine alone did not change the retention index, while all taurine concentrations tested here prevented the deleterious effect of alcohol on memory consolidation. Previous data showed that taurine prevents ethanol-induced hypolocomotion possibly by reducing ethanol amounts that reach the brain (Rosemberg et al., 2012). Importantly, although 1.0% ethanol impairs locomotor activity, this response was not sustained up to 24 h. Because taurine and ethanol did not affect locomotion, the changes on retention indexes described here are not associated with altered motor coordination, thereby reflecting a protective effect on ethanol-induced amnesia.

## **5. Conclusion**

In conclusion, we show a preventive role of taurine in a novel alcohol-induced blackout model using the zebrafish as a model organism, reinforcing its protective role in the CNS.

Moreover, we report how different shock frequencies affect learning, suggesting that “extrinsic factors” may influence the inhibitory avoidance performance in this aquatic species. Although more studies are necessary to clarify the neurochemical mechanisms involved in alcohol-mediated responses, our data support the growing utility of zebrafish as a tool to investigate how abuse substances affect learning and memory processes, as well as to screen novel therapeutic agents.

### **Acknowledgements**

The authors recognize financial support and fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Finance Code 001. K.T.B. receives CNPq fellowship grant. T.E.M., B.D.F., and F.F. receive CAPES fellowship grants. D.B.R receives the CNPq research productivity grant (process number 307595/2015-3) and his work is supported by PROEX/CAPES fellowship grant (process number 23038.005848/2018-31; grant number 0737/2018). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### **Conflict of interest**

The authors declare that no competing interest exists.

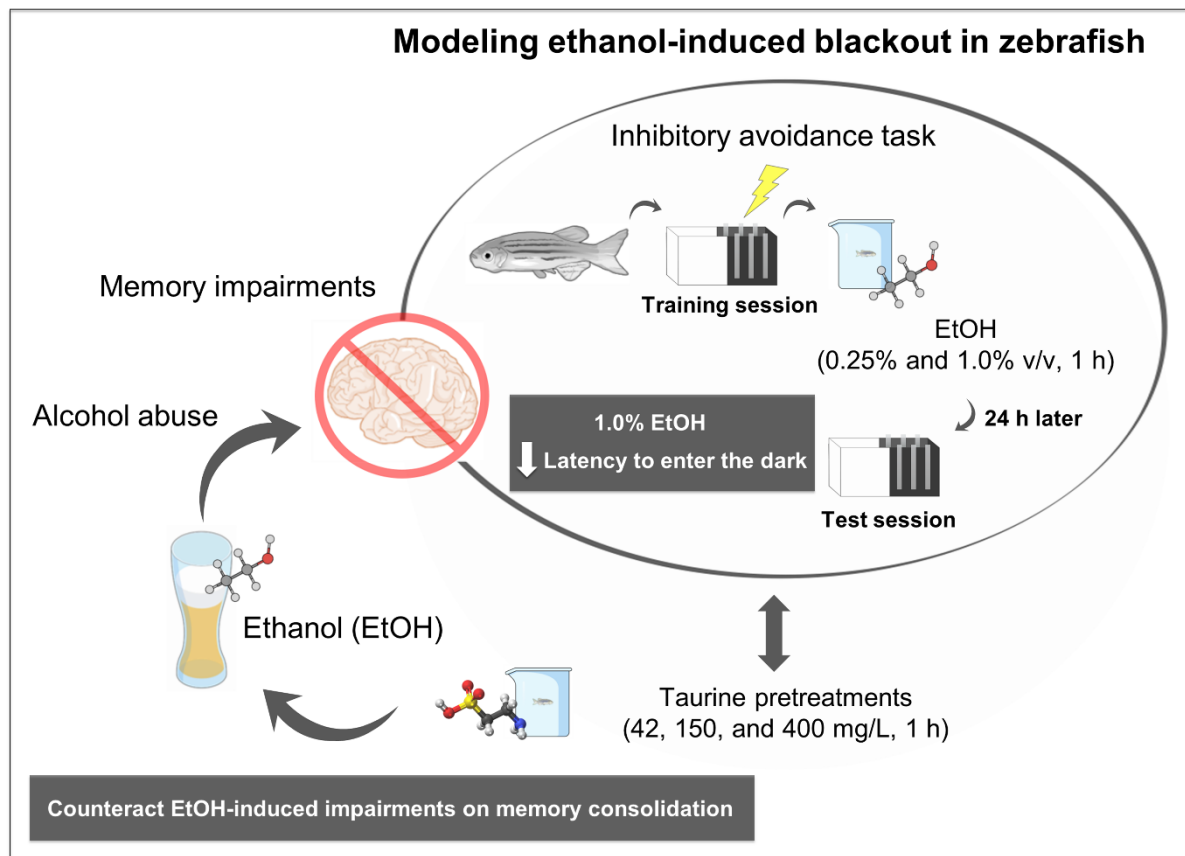
### **References**

- Amorim, R.R., Silva, P.F., Luchiari, A.C., 2017. Effects of Alcohol on Inhibitory Avoidance Learning in Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish* 14(5), 430-437.
- Banerjee, S.P., Ragnauth, A., Chan, C.Y., Agovic, M.S., Sostris, V., Jashanmal, I., Vidal, L., Friedman, E., 2013. Neuropsychopharmacological actions of taurine. *Adv Exp Med Biol* 775, 3-18.
- Blank, M., Guerim, L.D., Cordeiro, R.F., Vianna, M.R., 2009. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiol Learn Mem* 92(4), 529-534.

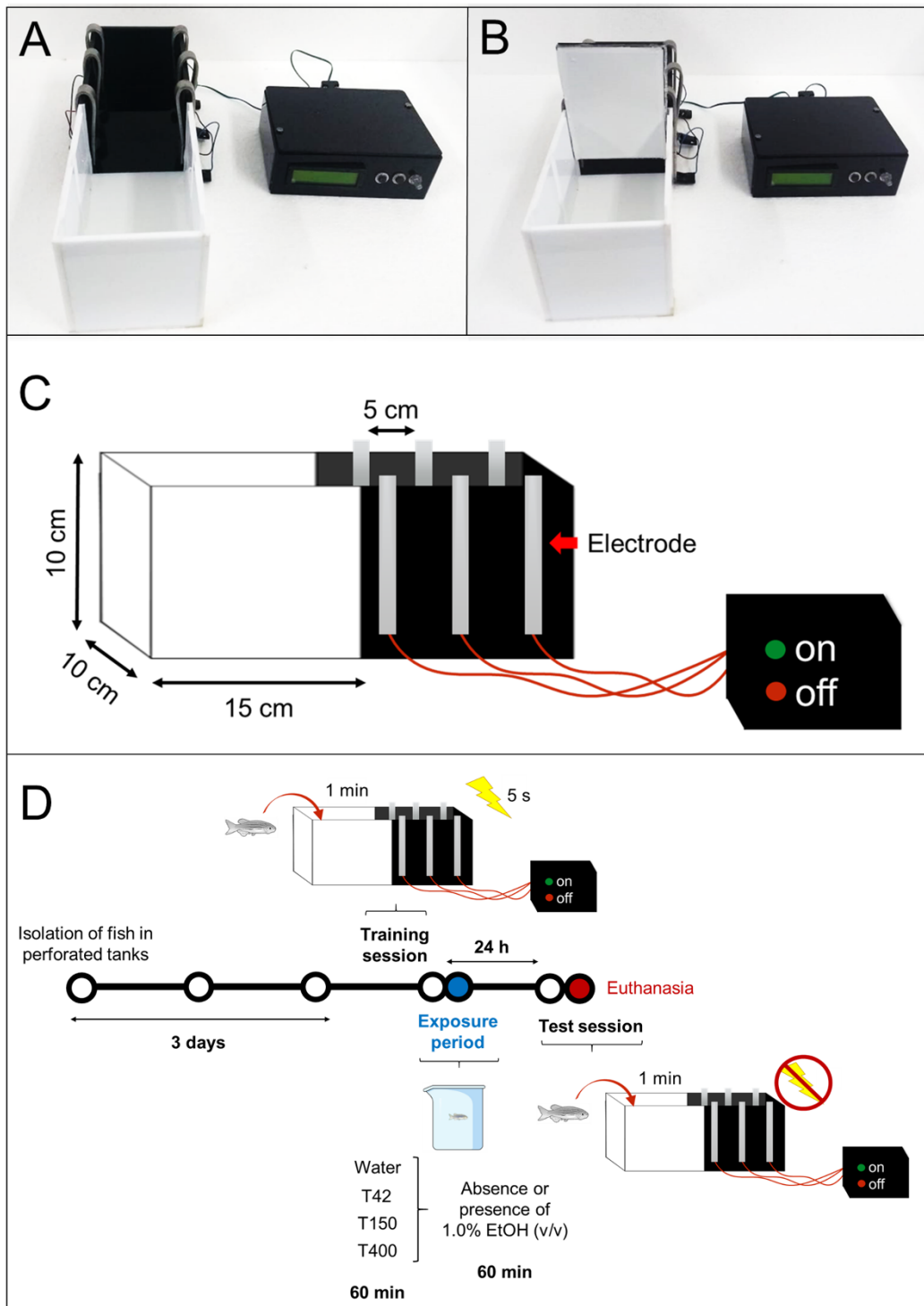
- Borba Filho, G.L., Zenki, K.C., Kalinine, E., Baggio, S., Pettenuzzo, L., Zimmer, E.R., Weis, S.N., Calcagnotto, M.E., Onofre de Souza, D., 2015. A new device for step-down inhibitory avoidance task--effects of low and high frequency in a novel device for passive inhibitory avoidance task that avoids bioimpedance variations. *PLoS One* 10(2), e0116000.
- Braford, M.R., Jr., 1995. Comparative aspects of forebrain organization in the ray-finned fishes: touchstones or not? *Brain Behav Evol* 46(4-5), 259-274.
- Buske, C., Gerlai, R., 2011. Early embryonic ethanol exposure impairs shoaling and the dopaminergic and serotonergic systems in adult zebrafish. *Neurotoxicol Teratol* 33(6), 698-707.
- Chan, C.Y., Sun, H.S., Shah, S.M., Agovic, M.S., Friedman, E., Banerjee, S.P., 2014. Modes of direct modulation by taurine of the glutamate NMDA receptor in rat cortex. *Eur J Pharmacol* 728, 167-175.
- Costardi, J.V., Nampo, R.A., Silva, G.L., Ribeiro, M.A., Stella, H.J., Stella, M.B., Malheiros, S.V., 2015. A review on alcohol: from the central action mechanism to chemical dependency. *Rev Assoc Med Bras* (1992) 61(4), 381-387.
- Curran, C.P., Marczynski, C.A., 2017. Taurine, caffeine, and energy drinks: Reviewing the risks to the adolescent brain. *Birth Defects Res* 109(20), 1640-1648.
- de la Monte, S.M., Kril, J.J., 2014. Human alcohol-related neuropathology. *Acta Neuropathol* 127(1), 71-90.
- Deschaux, O., Koumar, O.C., Canini, F., Moreau, J.L., Garcia, R., 2015. High-frequency stimulation of the hippocampus blocks fear learning sensitization and return of extinguished fear. *Neuroscience* 286, 423-429.
- Fontana, B.D., Mezzomo, N.J., Kalueff, A.V., Rosemberg, D.B., 2018. The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. *Exp Neurol* 299(Pt A), 157-171.
- Foos, T.M., Wu, J.Y., 2002. The role of taurine in the central nervous system and the modulation of intracellular calcium homeostasis. *Neurochem Res* 27(1-2), 21-26.
- Garin-Aguilar, M.E., Medina, A.C., Quirarte, G.L., McGaugh, J.L., Prado-Alcala, R.A., 2014. Intense aversive training protects memory from the amnesic effects of hippocampal inactivation. *Hippocampus* 24(1), 102-112.
- Gerlai, R., Chatterjee, D., Pereira, T., Sawashima, T., Krishnannair, R., 2009. Acute and chronic alcohol dose: population differences in behavior and neurochemistry of zebrafish. *Genes Brain Behav* 8(6), 586-599.
- Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., Rosenthal, A., 2000. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav* 67(4), 773-782.
- Herculano, A.M., Puty, B., Miranda, V., Lima, M.G., Maximino, C., 2015. Interactions between serotonin and glutamate-nitric oxide pathways in zebrafish scototaxis. *Pharmacol Biochem Behav* 129, 97-104.
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Tarrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J.C., Koch, R., Rauch, G.J., White, S., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L.T., Guerra-Assuncao, J.A., Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J.H., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Langley, E., Maguire, S.F., Laird, G.K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-King, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S., McLay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Elliot, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Begum, S., Mortimore, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey, A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Lloyd, C., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright,

- D., Collins, J., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., McGuire, S., Gilderthorp, R., Griffiths, C., Manthravadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Babbage, A., Hammond, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J., Tromans, A., Grafham, D., Skuce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Berger, A., Dooley, C.M., Ersan-Urun, Z., Eser, C., Geiger, H., Geisler, M., Karotki, L., Kirn, A., Konantz, J., Konantz, M., Oberlander, M., Rudolph-Geiger, S., Teucke, M., Lanz, C., Raddatz, G., Osoegawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Langford, C., Yang, F., Schuster, S.C., Carter, N.P., Harrow, J., Ning, Z., Herrero, J., Searle, S.M., Enright, A., Geisler, R., Plasterk, R.H., Lee, C., Westerfield, M., de Jong, P.J., Zon, L.I., Postlethwait, J.H., Nusslein-Volhard, C., Hubbard, T.J., Roest Crollius, H., Rogers, J., Stemple, D.L., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496(7446), 498-503.
- Hurtado-Parrado, C., Gonzalez-Leon, C., Arias-Higuera, M.A., Cardona, A., Medina, L.G., Garcia-Munoz, L., Sanchez, C., Cifuentes, J., Forigua, J.C., Ortiz, A., Acevedo-Triana, C.A., Rico, J.L., 2017. Assessing Mongolian gerbil emotional behavior: effects of two shock intensities and response-independent shocks during an extended inhibitory-avoidance task. *PeerJ* 5, e4009.
- Huxtable, R.J., 1992. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 72(1), 101-163.
- Kalueff, A.V., Gebhardt, M., Stewart, A.M., Cachat, J.M., Brimmer, M., Chawla, J.S., Craddock, C., Kyzar, E.J., Roth, A., Landsman, S., Gaikwad, S., Robinson, K., Baatrup, E., Tierney, K., Shamchuk, A., Norton, W., Miller, N., Nicolson, T., Braubach, O., Gilman, C.P., Pittman, J., Rosemberg, D.B., Gerlai, R., Echevarria, D., Lamb, E., Neuhaus, S.C., Weng, W., Bally-Cuif, L., Schneider, H., Zebrafish Neuroscience Research, C., 2013. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish* 10(1), 70-86.
- Kinkel, M.D., Eames, S.C., Philipson, L.H., Prince, V.E., 2010. Intraperitoneal injection into adult zebrafish. *J Vis Exp*(42).
- Lee, H., Roh, S., Kim, D.J., 2009. Alcohol-induced blackout. *Int J Environ Res Public Health* 6(11), 2783-2792.
- Lloyd, T., G, D.E.D., Strauss, G.R., Singer, K., 1986. A review of the use of electro-motor stimulation in human muscles. *Aust J Physiother* 32(1), 18-30.
- Lovinger, D.M., Roberto, M., 2013. Synaptic effects induced by alcohol. *Curr Top Behav Neurosci* 13, 31-86.
- Lovinger, D.M., White, G., Weight, F.F., 1990. NMDA receptor-mediated synaptic excitation selectively inhibited by ethanol in hippocampal slice from adult rat. *J Neurosci* 10(4), 1372-1379.
- Manuel, R., Gorissen, M., Roca, C.P., Zethof, J., van de Vis, H., Flik, G., van den Bos, R., 2014. Inhibitory avoidance learning in zebrafish (*Danio rerio*): effects of shock intensity and unraveling differences in task performance. *Zebrafish* 11(4), 341-352.
- Maximino, C., Meinerz, D.L., Fontana, B.D., Mezzomo, N.J., Stefanello, F.V., de, S.P.A., Batista, C.B., Rubin, M.A., Barbosa, N.V., Rocha, J.B.T., Lima, M.G., Rosemberg, D.B., 2018. Extending the analysis of zebrafish behavioral endophenotypes for modeling psychiatric disorders: Fear conditioning to conspecific alarm response. *Behav Processes* 149, 35-42.
- Mezzomo, N.J., Fontana, B.D., Kalueff, A.V., Barcellos, L.J.G., Rosemberg, D.B., 2018. Understanding taurine CNS activity using alternative zebrafish models. *Neurosci Biobehav Rev* 90, 471-485.
- Miller, R.R., Matzel, L.D., 2000. Memory involves far more than 'consolidation'. *Nat Rev Neurosci* 1(3), 214-216.
- Muller, T.E., Nunes, S.Z., Silveira, A., Loro, V.L., Rosemberg, D.B., 2017. Repeated ethanol exposure alters social behavior and oxidative stress parameters of zebrafish. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 79(Pt B), 105-111.

- Ng, M.C., Hsu, C.P., Wu, Y.J., Wu, S.Y., Yang, Y.L., Lu, K.T., 2012. Effect of MK-801-induced impairment of inhibitory avoidance learning in zebrafish via inactivation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in telencephalon. *Fish Physiol Biochem* 38(4), 1099-1106.
- Oja, S.S., Saransaari, P., 2013. Taurine and epilepsy. *Epilepsy Res* 104(3), 187-194.
- Parsons, O.A., Nixon, S.J., 1993. Neurobehavioral sequelae of alcoholism. *Neurol Clin* 11(1), 205-218.
- Pather, S., Gerlai, R., 2009. Shuttle box learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res* 196(2), 323-327.
- Rosemberg, D.B., Braga, M.M., Rico, E.P., Loss, C.M., Cordova, S.D., Mussulini, B.H., Blaser, R.E., Leite, C.E., Campos, M.M., Dias, R.D., Calcagnotto, M.E., de Oliveira, D.L., Souza, D.O., 2012. Behavioral effects of taurine pretreatment in zebrafish acutely exposed to ethanol. *Neuropharmacology* 63(4), 613-623.
- Rosemberg, D.B., da Rocha, R.F., Rico, E.P., Zanotto-Filho, A., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Moreira, J.C., Klamt, F., Souza, D.O., 2010. Taurine prevents enhancement of acetylcholinesterase activity induced by acute ethanol exposure and decreases the level of markers of oxidative stress in zebrafish brain. *Neuroscience* 171(3), 683-692.
- Samuelsson, M., Skogh, E., Lundberg, K., Vrethem, M., Ollinger, K., 2013. Taurine and glutathione in plasma and cerebrospinal fluid in olanzapine treated patients with schizophrenia. *Psychiatry Res* 210(3), 819-824.
- Schaffer, S.W., Jong, C.J., Ramila, K.C., Azuma, J., 2010. Physiological roles of taurine in heart and muscle. *J Biomed Sci* 17 Suppl 1, S2.
- Stewart, A.M., Braubach, O., Spitsbergen, J., Gerlai, R., Kalueff, A.V., 2014. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *Trends Neurosci* 37(5), 264-278.
- Tran, S., Gerlai, R., 2013. Time-course of behavioural changes induced by ethanol in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav Brain Res* 252, 204-213.
- Vik, P.W., Cellucci, T., Jarchow, A., Hedt, J., 2004. Cognitive impairment in substance abuse. *Psychiatr Clin North Am* 27(1), 97-109, ix.
- Vitvitsky, V., Garg, S.K., Banerjee, R., 2011. Taurine biosynthesis by neurons and astrocytes. *J Biol Chem* 286(37), 32002-32010.
- Vohra, B.P., Hui, X., 2000. Improvement of impaired memory in mice by taurine. *Neural Plast* 7(4), 245-259.
- White, A.M., Matthews, D.B., Best, P.J., 2000. Ethanol, memory, and hippocampal function: a review of recent findings. *Hippocampus* 10(1), 88-93.
- Williams, F.E., White, D., Messer, W.S., 2002. A simple spatial alternation task for assessing memory function in zebrafish. *Behav Processes* 58(3), 125-132.
- Wu, H., Jin, Y., Wei, J., Jin, H., Sha, D., Wu, J.Y., 2005. Mode of action of taurine as a neuroprotector. *Brain Res* 1038(2), 123-131.
- Wu, J.Y., Prentice, H., 2010. Role of taurine in the central nervous system. *J Biomed Sci* 17 Suppl 1, S1.
- Ziani, P.R., Muller, T.E., Stefanello, F.V., Fontana, B.D., Duarte, T., Canzian, J., Rosemberg, D.B., 2018. Nicotine increases fear responses and brain acetylcholinesterase activity in a context-dependent manner in zebrafish. *Pharmacol Biochem Behav* 170, 36-43.
- Zorumski, C.F., Mennerick, S., Izumi, Y., 2014. Acute and chronic effects of ethanol on learning-related synaptic plasticity. *Alcohol* 48(1), 1-17.

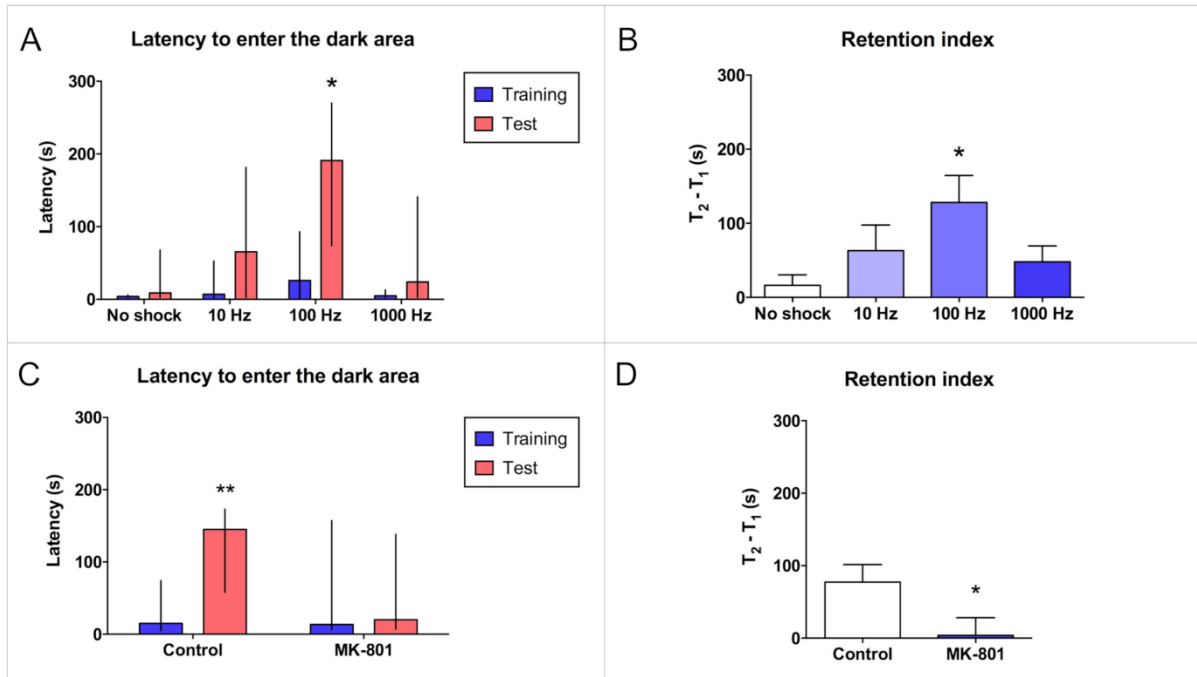


**Graphical abstract**

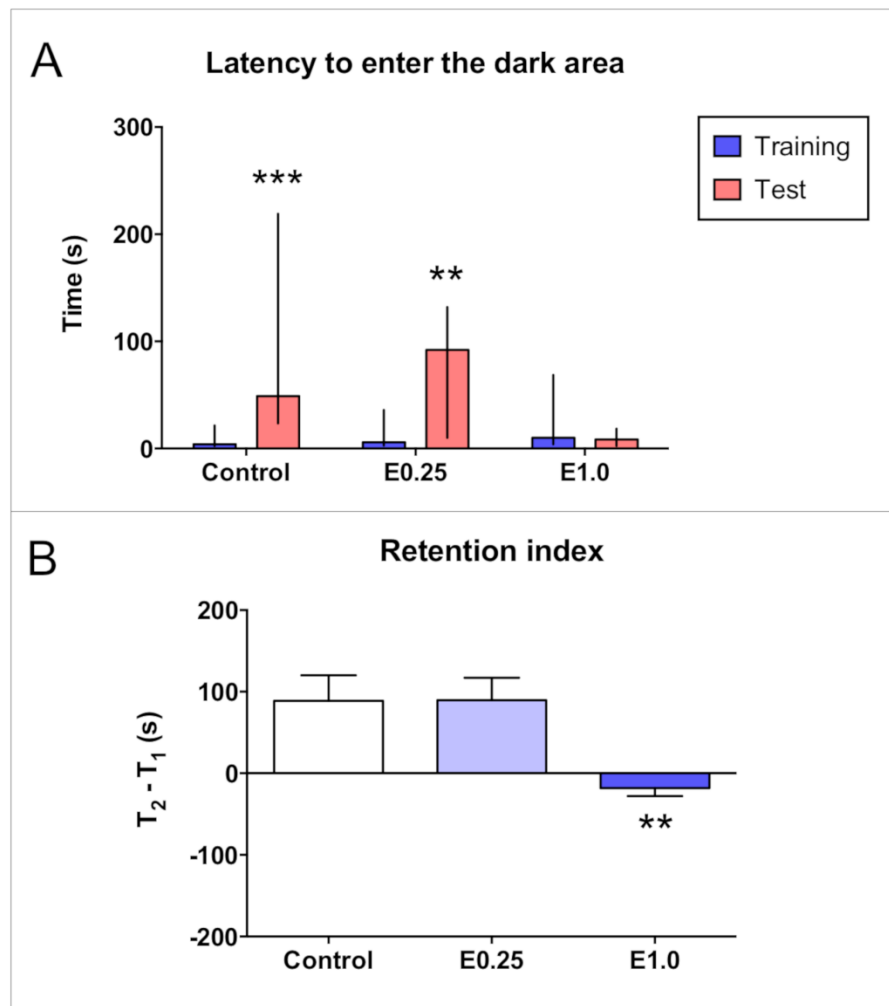


**Figure 1.** Inhibitory avoidance apparatus. **A-B.** Representative photos showing the electric source, electrodes, the bright and dark compartments, and the guillotine-type door. **C.** Schematic representation of the inhibitory avoidance tank and its respective dimensions. **D.** Experimental design and pharmacological manipulations.

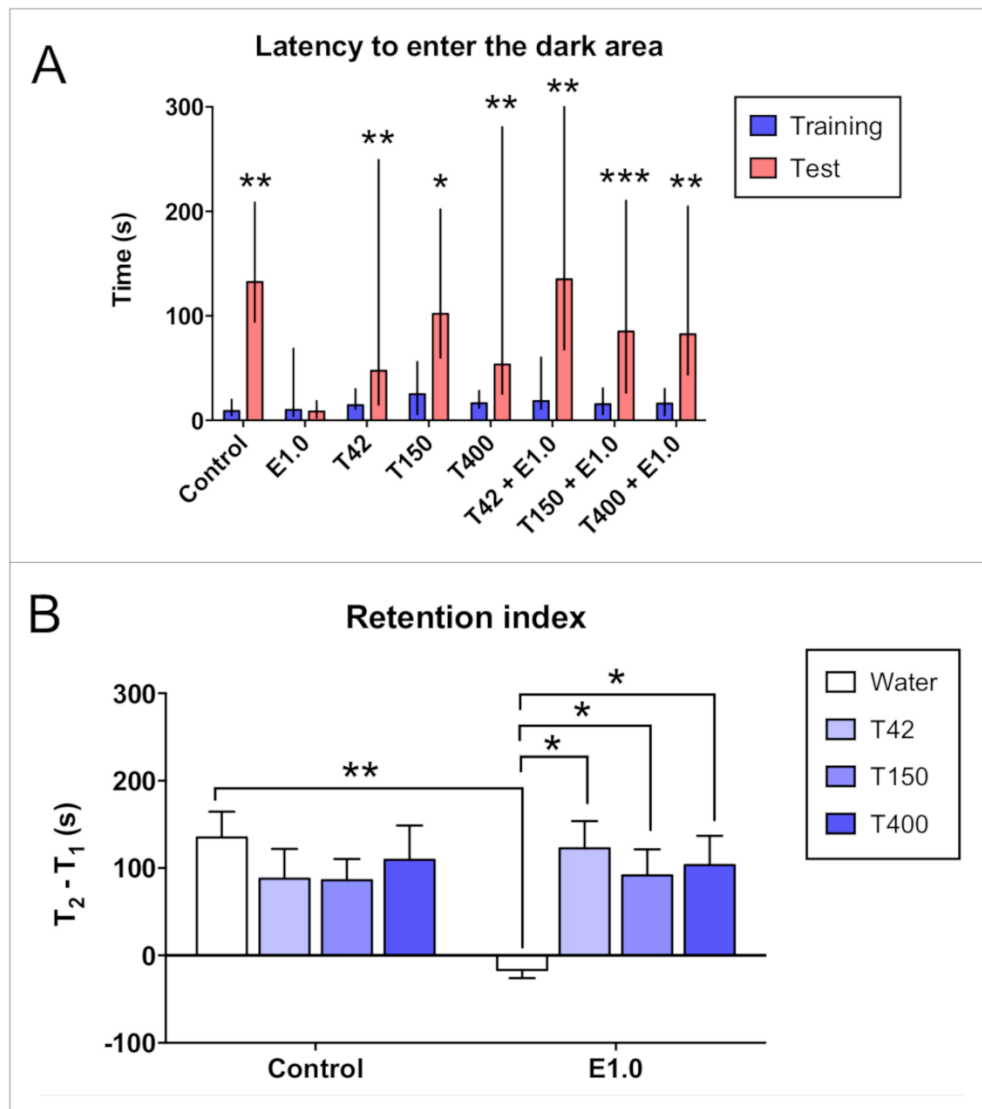




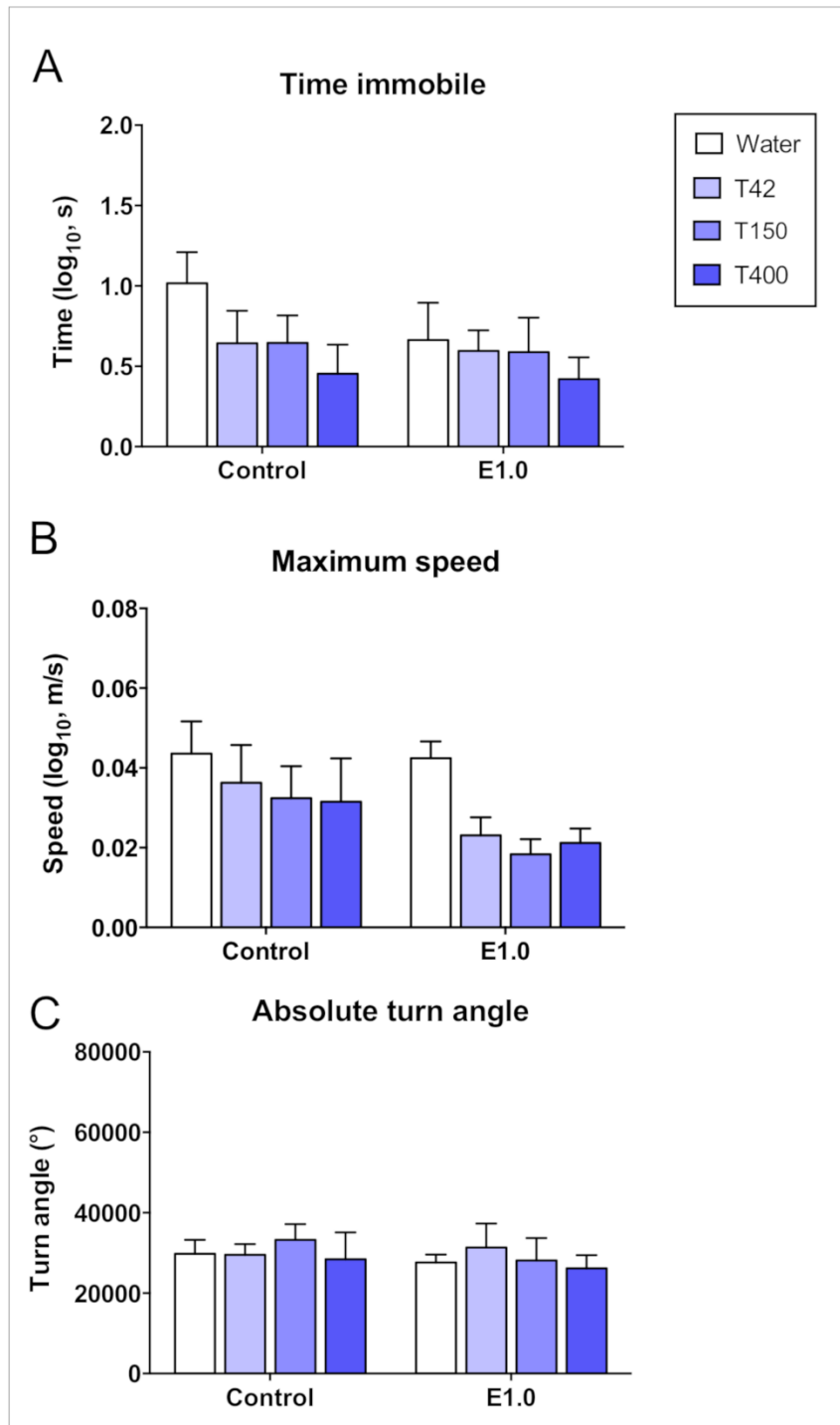
**Figure 2.** Influence of different shock frequencies on zebrafish inhibitory avoidance response and amnesic effects of MK-801. **A.** Latency to enter the dark area in training and test sessions when distinct shock frequencies were tested. **B.** Memory retention indexes showing positive effects of 100 Hz on learning. **C.** Effects of MK-801 on the latency to enter the dark area. **D.** Memory retention indexes reflecting amnesic effects of MK-801. Data showing differences between training and test sessions were expressed as median  $\pm$  interquartile range and analyzed by Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Asterisks above bars express significant differences between sessions. Retention indexes were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.) and analyzed by one-way ANOVA, followed by Dunnet's post-hoc test. Asterisks express differences when compared to control ( $n = 8-12$  animals per group; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ).



**Figure 3.** Effects of ethanol on zebrafish inhibitory avoidance performance. **A.** Latency to enter the dark area in training and test sessions. Data were expressed as median  $\pm$  interquartile range and analyzed by Wilcoxon matched-pairs signed rank test. Asterisks above bars express significant differences between sessions. **B.** Memory retention indexes. Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.) and analyzed by one-way ANOVA, followed by Dunnet's post-hoc test. Asterisks above bars express significant differences when compared to control ( $n = 11-13$  animals per group; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).



**Figure 4.** Protective effects of taurine on ethanol-induced blackout. **A.** Latency to enter the dark area in training and test sessions. Data were expressed as median  $\pm$  interquartile range and analyzed by Wilcoxon matched-pairs signed rank test. **B.** Memory retention indexes. Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.) and analyzed by two-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test. Asterisks above bars express significant differences among groups ( $n = 9-12$  animals per group; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).



**Figure 5.** Effects of ethanol on zebrafish locomotor parameters in the absence or presence of taurine 24 h after training session. **A.** Time immobile. **B.** Maximum speed. **C.** Absolute turn angle. Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.) and analyzed by two-way ANOVA. The level of significance was set at  $p \leq 0.05$  ( $n = 10-11$  animals per group).

## 5. CONCLUSÕES PARCIAIS

- No presente trabalho, descrevemos a primeira evidência de como diferentes frequências de choque afetam a resposta do peixe-zebra no teste da esQUIVA inibitória, onde verificou-se uma retenção significativa da memória após a administração de choque elétrico na frequência de 100 Hz;
- Peixes expostos ao MK-801 demonstraram déficit cognitivo na tarefa de esQUIVA inibitória, o que corrobora a utilização da frequência de 100 Hz para testes farmacológicos.
- Apesar do etanol na concentração de 0,25% não afetar a consolidação da memória, a exposição aguda ao etanol 1% prejudicou a consolidação da memória, sugerindo que altas concentrações induzem amnésia no peixe-zebra;
- Apesar da taurina sozinha não alterar o desempenho dos peixes no teste da esQUIVA inibitória, seu pré-tratamento previniu os efeitos causados pelo etanol;
- Taurina e etanol não afetam parâmetros relacionados à locomoção 24h após a exposição, sugerindo que alterações locomotoras não influenciam na resposta comportamental da esQUIVA inibitória.

## 6. CONCLUSÃO FINAL

Resumidamente, os resultados apresentados nessa dissertação demonstraram um papel preventivo da taurina em um novo modelo de blackout induzido por etanol utilizando o peixe-zebra como um organismo modelo, reforçando o papel protetor desta molécula no SNC. Além disso, observou-se como diferentes frequências de choque afetam a memória, sugerindo que fatores extrínsecos podem influenciar o desempenho desta espécie na esQUIVA inibitória. Embora mais estudos sejam necessários para esclarecer os mecanismos neuroquímicos envolvidos nas respostas mediadas pelo álcool, os dados aqui discutidos apoiam a crescente utilidade do peixe-zebra como uma ferramenta para investigar como as substâncias de abuso afetam os processos de aprendizagem e memória, bem como para rastrear novos agentes terapêuticos.

## 7. PERSPECTIVAS DO ESTUDO

Este trabalho demonstrou os efeitos protetores da taurina diante o déficit cognitivo induzido por etanol. Assim, as perspectivas do estudo são:

- Avaliar os efeitos da taurina após exposição aguda ao etanol nas fases da aquisição e evoção da memória;
- Verificar os efeitos da exposição crônica ao etanol na memória e aprendizagem, bem como a influência do tratamento com a taurina a longo prazo;
- Explorar os efeitos da taurina em déficit cognitivo induzido por etanol em outros aparatos de avaliação da memória e aprendizagem, como reconhecimento de objetos.

## REFERÊNCIAS

- AMSTERDAM, J. V. et al. European rating of drug harms. **Journal of Psychopharmacology**. v. 29, p. 655-60, 2015.
- AMORIM, R. R.; SILVA, P. F.; LUCHIARI, A. Effects of Alcohol on Inhibitory Avoidance Learning in Zebrafish (*Danio rerio*). **Zebrafish**. v. 5, p. 430 – 437, 2017.
- BANERJEE, S. P. et al. Neuropsychopharmacological actions of taurine. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 775, p. 3–18, 2013.
- BARBAZUK, W. et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. **Genome Research**. v. 10, p. 1351-1358, 2000.
- BISAZ, R.; TRAVAGLIA, A.; ALBERINI, C. The neurobiological bases of memory formation: from physiological conditions to psychopathology. **Psychopathology**. v. 47, p. 347-346, 2014.
- BRAUBACH, R. et al. Olfactory conditioning in the zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**. v. 198, p. 190–198, 2009.
- BRAFORD, M. Comparative aspects of forebrain organization in the ray-finned fishes: touchstones or not?. **Brain, Behavior and Evolution**. v. 46, p. 259–274, 1995.
- BUSKE, C.; GERLAI, R. Early embryonic ethanol exposure impairs shoaling and the dopaminergic and serotonergic systems in adult zebrafish. **Neurotoxicology Teratology**. v. 33, p. 698-707, 2011.
- CAMPBELL, W. A. et al. Zebrafish lacking Alzheimer presenilin enhancer 2 (Pen- 2) demonstrate excessive p53-dependent apoptosis and neuronal loss. **Journal of Neurochemistry**. v. 96, p. 1423–1440, 2006.
- CARLSON, N. R. **Physiology of behaviour**. Massachusetts: Pearson, 2001.
- CEDERBAUM, A. Alcohol metabolismo. **Clinical Liver Disease**. v. 16, p. 667-685, 2012.
- CHACON, D.M.; LUCHIARI, A. C. A dose for the wiser is enough: the alcohol benefits for associative learning in zebrafish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 53, p. 109 -115, 2014.
- CHAN, C. et al. Modes of direct modulation by taurine of the glutamate NMDA receptor in rat cortex. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 5, p. 167–175, 2014.
- CHANDLER, L. Ethanol and brain plasticity: receptors and molecular networks of the postsynaptic density as targets of ethanol. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 99, p. 311-316, 2003.
- CONTRERAS, F. et al. Age-Dependent Effects of Acute Alcohol Administration in the Hippocampal Phosphoproteome. **Chem. Res. Toxicol.** v. 30, p. 2165–2173, 2017.
- COSTARDI, J. et al. A review on alcohol: from the central action mechanism to chemical

- dependency. **Revista da Associação Medica Brasileira**. v. 61, p. 381-387, 2015.
- CURRAN, C. P.; MARCZINSKI, C. A. Taurine, caffeine, and energy drinks: Reviewing the risks to the adolescent brain. **Birth Defects Research**. v. 109, p. 1640-1648, 2017.
- FONTANA, B. et al. The developing utility of zebrafish models of neurological and neuropsychiatric disorders: A critical review. **Experimental Neurology**. v. 299, p. 157-171, 2018.
- GERLAI R. et al. Acute and Chronic alcohol dose: Population differences in behavior and neurochemistry of zebrafish. **Genes, Brain and Behavior**. v. 8, p. 586–599, 2009.
- GERLAI, R. et al. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 4, p. 773–782, 2000.
- GOULD, T. Addiction and Cognition. **Addiction Science & Clinical Practice**. v. 6, p. 4-14, 2010.
- HARPER, C. The neuropathology of alcohol-related brain damage. **Alcohol**. v. 44, p. 136-40, 2009.
- HIPÓLITO, L. Brain Metabolism of Ethanol and Alcoholism: An Update. **Current Drug Metabolism**. v. 8, p. 716-727, 2007.
- HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**. v. 496, p. 498-503, 2013.
- HUXTABLE, R. Physiological actions of taurine. **Physiological Reviews**. v. 72, p. 101-163, 1992.
- JUNG, Y. C.; NAMKOONG, K. Alcohol: intoxication and poisoning - diagnosis and treatment. **Handbook of Clinical Neurology**. v. 125, p. 115 -121, 2014.
- KALUEFF, A.V. et al. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. **Zebrafish**. v. 10, p. 70-86, 2013.
- KANDEL, E. R. **In search of memory: The emergence of a new science of mind**. New York: W. W. Norton & Company. 2006.
- KIM, Y. J. et al. Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). **Neuroscience Letters**. v. 355, p. 29-32, 2004.
- LANTMAN, M. et al. The impact of alcohol hangover symptoms on cognitive and physical functioning, and mood. **Human Psychopharmacology**. v. 32, p. e2623, 2017.
- LELE, Z.; KRONE, P. H. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. **Biotechnology Advances**. v.14, p. 57-72. 1996.
- LOVINGER, D.; ROBERTO, R. Synaptic effects induced by alcohol. **Current Topics in Behavioral Neurosciences**. v.13, p. 31-86, 2013.
- LOVINGER, D.M.; WHITE G.; WEIGHT, F.F. NMDA receptor-mediated synaptic excitation



selectively inhibited by ethanol in hippocampal slice from adult rat. **Journal of Neuroscience**. v. 10, p. 1372–1379, 1990.

MAXIMINO, C. et al. Extending the analysis of zebrafish behavioral endophenotypes for modeling psychiatric disorders: Fear conditioning to conspecific alarm response. **Behavioural Processes**. v. 149, p. 35-42, 2018.

MEZZOMO, N. J. et al. Understanding taurine CNS activity using alternative zebrafish models. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v. 83, p. 525-539, 2018.

MEZZOMO, N. et al. The role of taurine on anxiety-like behaviors in zebrafish: A comparative study using the novel tank and the light-dark tasks. **Neuroscience Letter**. v. 2, p. 19-24, 2016.

MILLER, R. R.; MATZEL, L. D. Memory involves far more than 'consolidation'. **Nature Review Neuroscience**. v. 3, p. 214-216, 2000.

MISRA, U. K. et al. Chronic ethanol treatment induces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production selectively in pericentral regions of the liver lobule. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**. v. 16, p. 839–842, 1992.

MOURÃO JUNIOR, C.; FARIA, F. Memory. **Psychology/Psicologia Reflexão e Crítica**. v. 28, p. 780-788, 2015.

MULLER, T. et al. Repeated ethanol exposure alters social behavior and oxidative stress parameters of zebrafish. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 79, p. 105-111, 2017.

NADEL, P. et al. Memory formation, consolidation and transformation. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v. 7, p. 1640 – 1645, 2012.

NUSSLEIN-VOLHARD, C.; SINGH, A. How fish color their skin: A paradigm for development and evolution of adult patterns. **Bioessays**. v. 39, p. 1-11, 2017.

OJA, S. S.; SARANSAARI, P. Taurine and epilepsy. **Epilepsy Research**. v. 104, p. 187-194, 2013.

PARK, H. et al. *Salvia miltiorrhiza* bunge blocks ethanol-induced synaptic dysfunction through regulation of NMDA receptor-dependent synaptic transmission. **Biomolecules & Therapeutics**. v. 24, p. 433-437, 2016.

PARKER, M.O. et al. Housing conditions differentially affect physiological and behavioural stress responses of zebrafish, as well as the response to anxiolytics. **Plos One**. v. 7, p. e34992, 2012.

PATHER, S.; GERLAI, R. Shuttle box learning in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**. v. 196, p. 323–327, 2009.

QUERTEMONT, E.; TAMBOUR, S.; TIRELLI, E. The role of acetaldehyde in the neurobehavioral effects of ethanol: a comprehensive review of animal studies. **Progress in Neurobiology**. v. 75, p. 247-74, 2005.

RICO, E. et al. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish

brain. **Toxicology Letter**. v. 174, p. 25-30, 2007.

RIPPS H.; SHEN, W. Review: Taurine: a “very essential” amino acid. **Molecular Vision**. v. 18, p. 2673-2686, 2012.

ROSEMBERG, D. B. et al. Behavioral effects of taurine pretreatment in zebrafish acutely exposed to ethanol. **Neuropharmacology**. v. 63, p. 613–623, 2012.

ROSEMBERG, D.B. et al. Taurine prevents enhancement of acetylcholinesterase activity induced by acute ethanol exposure and decreases the level of markers of oxidative stress in zebrafish brain. **Neuroscience**. v. 171, p. 683–692, 2010.

SAMUELSSON, M. et al. Taurine and glutathione in plasma and cerebrospinal fluid in olanzapine treated patients with schizophrenia. **Psychiatry Research**. p. 819–824, 2013.

SCHILLING, T. The morphology of larval and adult peixe-zebra. **Oxford University Press**. p.59-94, 2002.

SCHAFFER, S.W. et al. Physiological roles of taurine in heart and muscle. **Journal of Biomedical Science**. v. 17, p. 233-241, 2010.

STEWART, A.M. et al. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. **Trends Neuroscience**. v. 37, p. 264-278, 2014.

SWIFT, R. Direct measurement of alcohol and its metabolites. **Addiction**. v. 2, p. 73 – 80, 2003.

SWIFT, R.; DAVIDSON, D. Alcohol hangover: mechanisms and mediators. **Alcohol Health Research World**. v. 22, p. 54–60, 1998.

TRAN, S.; FACCIOL, A.; GERLAI, R. Home tank water versus novel water differentially affect alcohol-induced locomotor activity and anxiety related behaviours in zebrafish. **Pharmacology Biochemistry Behavior**. v. 144, p. 13-19, 2016.

TRAN, S.; GERLAI, R. Time-course of behavioural changes induced by ethanol in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavior Brain Research**. v. 252, p. 204 -213, 2013.

VIK, P.W.; CELLUCCI, T.; JARCHOW, A.; HEDT, J. Cognitive impairment in substance abuse. **Psychiatric Clinics of North America**. v. 27, p. 97-109, 2004.

VOLKOW, N.; LI, T. K. The neuroscience of addiction. **Nature Neuroscience**. v. 8, p. 1429–1430, 2005.

VITVITSKY, V.; GARG, S. K.; BANERJEE, R. Taurine biosynthesis by neurons and astrocytes. **Journal of Biological Chemistry**. v. 286, p. 32002-32010, 2011.

WILLIAMS, F. E., WHITE, D., & MESSER, W. S. A simple spatial alternation task for assessing memory function in zebrafish. **Behavioural Processes**. v. 58, p. 125–132, 2002.

WHITE, A. M.; MATTHEWS, D. B.; BEST, P. J. Ethanol, memory, and hippocampal function: a review of recent findings. **Hippocampus**. v. 10, p. 88-93, 2000.

World Health Organization (WHO). Global status report on alcohol and health, 2014.

WU, H. et al. Mode of action of taurine as a neuroprotector. **Brain Research**. v. 1038, p. 123-131, 2005.

WU, J.Y.; PRENTICE, H. Role of taurine in the central nervous system. **Journal of Biomedical Science**. v. 17, p. 12-24, 2010.

YUCEL, M. et al. Understanding drug addiction: a neuropsychological perspective. **Australian & New Zealand Journal of Psychiatry**. v. 41, p. 957, 2007.

ZAKHARI, S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? **Alcohol research & health**. v. 29, 245-254, 2006.

ZORUMSKI, C. F.; MENNERICK, S.; IZUMI, Y. Acute and chronic effects of ethanol on learning-related synaptic plasticity. **Alcohol**. v. 48, p. 1-17, 2014.

**ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO CEUA/UFSM****UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM****CARTA DE APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

**Título do Projeto:** "Avaliação neuroquímica e comportamental dos efeitos promovidos pela taurina em peixe zebra expostos ao etanol: uma abordagem em modelos de exposição aguda e crônica".

**Número do Parecer:** 026/2014

**Pesquisador Responsável:** Prof. Drº Denis Broock Rosemberg

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

**OBS:** Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

**DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO:** 08/05/2014.

Santa Maria, 08 de Maio de 2014.

Profª Drª Vania Lucia Loro

Vice - Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais- UFSM

# ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO

PROGRESS IN  
**Neuro-Pharmacology & Biological Psychiatry**

Denis Rosenberg | My Journals | Log Out | Help **EVISE**

Home Reports

My Reviewer Tasks My Author Tasks

[Start New Submission](#) Click here to view your submissions with a final decision

**My Submissions with Journal (1)**

<p><b>Taurine prevents memory consolidation deficits in a novel alcohol-induced blackout model in zebrafish</b> Current status: With Editor (29Nov/2018)</p>	<p>PNP_2018_848 Editor-in-Chief: Louis Gendron Article Type: Research Paper Initial submission : 29/Nov/2018</p>
--	--