

HENRIQUE TEZA BERNARDO

**MODELO DE EXPOSIÇÃO INTERMITENTE AO ETANOL
ALTERA PARÂMETROS DO SISTEMA COLINÉRGICO,
ESTRESSE OXIDATIVO E COMPORTAMENTO EM PEIXE-
ZEBRA**

**CRICIÚMA
2017**

HENRIQUE TEZA BERNARDO

**MODELO DE EXPOSIÇÃO INTERMITENTE AO ETANOL
ALTERA PARÂMETROS DO SISTEMA COLINÉRGICO,
ESTRESSE OXIDATIVO E COMPORTAMENTO EM PEIXE-
ZEBRA**

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

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Pacheco
Rico

**CRICIÚMA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B523m Bernardo, Henrique Teza.

Modelo de exposição intermitente ao etanol altera parâmetros do sistema colinérgico, estresse oxidativo e comportamento em peixe-zebra / Henrique Teza Bernardo. - 2017.

84 p. : il.; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2017.

Orientação: Eduardo Pacheco Rico.

1. Álcool – Consumo – Efeitos colaterais. 2. Alcoolismo.
3. Beber em binge. 4. Sistema colinérgico. 5. Estresse oxidativo.
6. Acetilcolinesterase. 7. Colina acetiltransferase. I. Título.

CDD 23. ed. 616.861

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla – CRB 14/1101

Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão.


Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

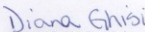
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 293

Com início às 14h00 (quatorze horas) do dia vinte e quatro do mês de agosto de 2017 (dois mil e dezessete), realizou-se, no Mini Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **Henrique Teza Bernardo**, sob a orientação do Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico, intitulada **"MODELO DE EXPOSIÇÃO INTERMITENTE AO ETANOL ALTERA PARÂMETROS DO SISTEMA COLINÉRGICO, ESTRESSE OXIDATIVO E COMPORTAMENTO EM PEIXE-ZEBRA"**. A dissertação foi examinada por uma banca examinadora constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado; Prof.ª Dra. Samira da Silva Valvassori (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovado e Prof. Dr. Leonardo José Gil Barcellos (Universidade de Passo Fundo - UPF) – 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 15h00 (quinze horas), dos quais eu, Diana Ghisi Daniel, 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 a Prof.ª Dra. Maria Inês da Rosa Coordenadora do Programa. Criciúma, 24 (vinte e quatro) de agosto de 2017 (dois mil e dezessete).


Prof.ª Dra. Maria Inês da Rosa
Coordenadora do PPGCS


Diana Ghisi Daniel
Secretária

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Sinalização Neural e Psicofarmacologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde na Universidade do Extremo Sul Catarinense e no Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

*Aos meus maiores mestres:
meus pais.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade do Extremo Sul Catarinense, que me fez crescer desde minha graduação, bem como durante todo o mestrado.

A todos os professores e equipe do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde por todo o conhecimento compartilhado ao longo desses dois anos.

À equipe do Laboratório de Sinalização Neural e Psicofarmacologia, que com esforço, dedicação e suas cabeças pensantes contribuíram neste trabalho: Helena, Jotele, Karine, Marcel, Naithan e Samira.

Ao meu orientador, professor e amigo Eduardo Pacheco Rico, que me direcionou e instigou a buscar o conhecimento durante todo o mestrado. Obrigado por disponibilizar horas do seu tempo para transmitir seu rico conhecimento para mim.

A minha família, em especial meus pais, Ida e Paulo; que sempre me guiaram pelo caminho correto e nunca deixaram de me apoiar.

RESUMO

O álcool é capaz de causar uma série de danos em tecidos e órgãos, destacando os seus efeitos nocivos ao cérebro ao modular uma série de mecanismos e vias, como alterações nos sistemas de neurotransmissão, ativação de vias pró-oxidantes e indução do sistema pró-inflamatório. Dentre os padrões de consumo de bebidas alcóolicas, um padrão se destaca, o binge alcóolico. Esse comportamento de consumo é caracterizado pela ingestão de altas doses de álcool em um único episódio, seguido de um período sem a ingestão de bebidas alcóolicas. Por ser um comportamento de consumo pouco estudado, a compressão dos efeitos do etanol sobre o cérebro nesse padrão de consumo é de grande importância. Neste contexto, o propósito do presente estudo foi avaliar os efeitos de um modelo que mimetiza o comportamento de consumo binge alcóolico (*weekly-binge*) sobre a sinalização colinérgica, resposta oxidativa e inflamatória em cérebro de peixe-zebra. Também avaliamos alterações comportamentais locomotoras e exploratórias nos animais submetidos ao mesmo modelo de exposição. O modelo consistiu em três exposições ao etanol (1,4%v/v) por 30 minutos. Os grupos foram divididos conforme o tempo de análise após a terceira e última exposição ao etanol, sendo eles: WB-I (analisado imediatamente após a última exposição), WB-2 (após 2 dias) e WB-9 (após 9 dias). Parte dos animais de cada grupo sofreu eutanásia e tiveram o cérebro total dissecado para as análises bioquímicas, sendo que o restante foi utilizado no teste comportamental. Para verificação de estresse oxidativo, foram avaliados os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), a oxidação de diclorofluoresceína (DCFH) e a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Parâmetros relacionados a eventos inflamatórios foram avaliados através da análise da expressão dos genes relacionados às citocinas IL-1 β , IL-10 e TNF- α . Do sistema colinérgico, foram avaliadas as atividades das enzimas colina acetiltransferase (ChAT) e acetilcolinesterase (AChE). Na análise comportamental, utilizou-se o teste *Novel tank*. Ao analisar os parâmetros de estresse oxidativo foi verificado aumento nos níveis de TBA-RS e aumento da oxidação de DCFH apenas no grupo WB-I. Sobre as enzimas antioxidantes, alterações foram observadas nos grupos WB-2 e WB-9, caracterizado pela diminuição de CAT nesses grupos. O *weekly-binge* não foi capaz de promover alterações da expressão gênica para IL-1 β , IL-10 e TNF- α . Sobre o sistema colinérgico, o modelo de exposição foi capaz de aumentar a atividade de ChAT no grupo WB-I

enquanto no grupo WB-9 uma diminuição de atividade foi percebida. A atividade de AChE apresentou diminuição nos grupos WB-2 e WB-9. No teste comportamental *Novel tank*, o *weekly-binge* foi capaz de promover um efeito ansiolítico no grupo WB-1 e WB-2 ao alterar o comportamento exploratório dos animais. Diante os resultados obtidos nos parâmetros do estresse oxidativo e sistema colinérgico, podemos sugerir que vias pró-oxidantes podem alterar a transmissão colinérgica, bem como a alteração comportamental pode ser uma resposta da alteração nesse sistema de neurotransmissão. Estes resultados contribuem para uma melhor compreensão dos mecanismos patológicos envolvidos no consumo intermitente do etanol.

Palavras-chave: Etanol; Beber em Binge; Estresse oxidativo; Colina acetiltransferase; Acetilcolinesterase; Comportamento.

ABSTRACT

Alcohol is a substance capable of causing several tissue and organ's damage, highlighting its harmful effects on the brain by modulating many mechanisms and pathways, such as changes in neurotransmission systems, activation of pro-oxidant pathways, and induction pro-inflammatory system. Among the patterns of consumption of alcoholic beverages, a standard stands out, the binge drinking. This behavior of consumption is characterized by the ingestion of high doses of alcohol in a single episode, followed by a period without the ingestion of alcoholic beverages. Because it is a behavior of little consumption studied, the compression of the effects of ethanol on the brain in this pattern of consumption is of great importance. In this context, the purpose of the present study was to evaluate the effects of a model that mimics the binge drinking (weekly-binge) on cholinergic signaling, oxidative and inflammatory responses in zebrafish brain. We also evaluated locomotor and exploratory behavioral changes in the animals submitted to the same model of exposure. The model consisted of three exposures to ethanol (1.4% v / v) for 30 minutes. The groups were divided according to the time of analysis after the third and last exposure to ethanol: WB-I (analyzed immediately after the last exposure), WB-2 (after 2 days) and WB-9 (after 9 days). Part of the animals in each group underwent euthanasia and had the whole brain dissected for biochemical analyzes, the remainder being used in the behavioral test. To verify oxidative stress, the levels of thiobarbituric acid reactive species (TBA-RS), dichlorofluorescein oxidation (DCFH) and the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were evaluated. Parameters related to inflammatory events were evaluated by analyzing the expression of genes related to cytokines IL-1 β , IL-10 and TNF- α . From the cholinergic system, the activities of the enzymes choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholinesterase (AChE) were evaluated. In the behavioral analysis, the Novel tank test was used. When analyzing the parameters of oxidative stress, there was an increase in TBA-RS levels and an increase in the oxidation of DCFH in the WB-I group. Regarding the antioxidant enzymes, changes were observed in the WB-2 and WB-9 groups, characterized by the decrease of CAT in these groups. The weekly-binge was not able to promote alterations of the gene expression for IL-1 β , IL-10 and TNF- α . On the cholinergic system, the exposure model could increase the ChAT activity in the WB-I group while in the WB-9 group

a decrease in activity was apparent. AChE activity decreased in the WB-2 and WB-9 groups. In the Novel tank behavioral test, the weekly-binge could promote an anxiolytic effect in the WB-1 and WB-2 groups by altering the exploratory behavior of the animals. Considering the results obtained in the parameters of oxidative stress and cholinergic system, we can suggest that pro-oxidant pathways can alter cholinergic transmission, as well as the behavioral alteration may be a response of the alteration in this neurotransmission system. These results contribute to a better understanding of the pathological mechanisms involved in the intermittent consumption of ethanol.

Keywords: Ethanol; Binge drinking; Oxidative stress; Choline O-Acetyltransferase; Acetylcholinesterase; Behavior.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação do metabolismo hepático e cerebral do etanol	31
Figura 2: Representação da sinalização colinérgica.....	39
Figura 3: Protocolo experimental <i>weekly-binge</i> em peixe-zebra adulto	46
Figura 4: Figura representativa das dimensões e zonas determinadas no aparato <i>Novel tank</i>	51
Figura 5: Efeito do <i>weekly-binge</i> sobre os níveis de ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em cérebro total de peixe-zebra.....	53
Figura 6: Efeito do <i>weekly-binge</i> sobre a oxidação de DCFH em cérebro total de peixe-zebra.	54
Figura 7: Efeito do <i>weekly-binge</i> sobre as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) (A) e catalase (CAT) (B) em cérebro total de peixe-zebra.	55
Figura 8: Efeito do <i>weekly-binge</i> sobre a expressão gênica das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-10 em cérebro total de peixe-zebra.....	56
Figura 9: Efeito do <i>weekly-binge</i> sobre a atividade das enzimas colinacetiltransferase (ChAT) e acetilcolinesterase (AChE) em cérebro total de peixe-zebra.	57
Figura 10: Avaliação do efeito do <i>weekly-binge</i> sobre a distância total percorrida e velocidade média no aparato <i>Novel tank</i>	58
Figura 11: Avaliação do efeito do <i>weekly-binge</i> no tempo de permanência na zona topo, meio e fundo no aparato <i>Novel tank</i>	59
Figura 12: Avaliação do efeito do <i>weekly-binge</i> no tempo relativo de permanência e traço de nado no aparato <i>Novel tank</i>	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 4-PDS- 4'4 ditiopiridona
4-TP- 4-tiopiridona
Acetil-CoA - Acetil coenzima A
ACh – Acetilcolina (do inglês, *acetylcholine*)
AChE – Acetilcolinesterase (do inglês *acetylcholinesterase*)
AcSCh – Iodeto de acetilcolina (do inglês, *acetylthiocholine iodide*)
ADH – Álcool desidrogenase (do inglês, *alcohol dehydrogenase*)
ALDH – Aldeído desidrogenase (do inglês, *aldehyde dehydrogenase*)
ANOVA - Análise de variância
CAT – catalase
cDNA- Ácido desoxirribonucléico complementar
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
ChAT – Colina acetiltransferase (do inglês, *choline acetyltransferase*)
CID-10 – Classificação Internacional de Doenças – versão 10
CPF – Cortex pré-frontal
CoA – Coenzima A
CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CYP450 – Citocromo P450
DCF-DA - diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (do inglês, *2,7-dichlorofluorescein diacetate*)
DCFH - 2,7-diclorofluoresceína (do inglês, *2,7-dichlorofluorescein*)
DNA- Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)
DTNB - Ácido ditionitrobenzóico (do inglês, *dithionitrobenzoic acid*)
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético (do inglês, *ethylenediaminetetraacetic acid*)
EROs - Espécies reativas de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species*)
IL-1 β - Interleucina IL-1 beta (do inglês, *interleukin-1 beta*)
LPS – Lipopolissacarídeo (do inglês, *lipopolysaccharide*)
MEOS - Sistema Microssomal de Oxidação do Etanol (do inglês, *microsomal ethanol oxidizing system*)
nAChRs – Receptores de acetilcolina nicotínicos (do inglês, *nicotinic acetylcholine receptors*)
NAD⁺ - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma oxidada (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide*)
NADH - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma reduzida (do inglês, *reduced nicotinamide adenine dinucleotide*)

NADP⁺ - Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma oxidada (do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)
NADPH - Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, forma reduzida (do inglês, *reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)
PBS – Tampão fosfato-salina (do inglês, *phosphate buffered saline*)
pH - Potencial hidrogeniônico
Pi - Fosfato inorgânico
RNA - Ácido ribonucleico (do inglês, *ribonucleic acid*)
PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction*)
SNC – Sistema Nervoso Central
SOD – Superóxido dismutase
TBA-RS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, *thiobarbituric acid reactive substances*)
TCA - Ácido tricloroacético
TNB - 2-nitro-5-tiobenzóico (do inglês, *2-Nitro-5- thiobenzoic acid*)
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alpha (do inglês, *tumor necrosis factor alpha*)
vAChT – Transportador vesicular de acetilcolina (do inglês, *vesicular acetylcholine transporter*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
1.1 EFEITOS DO ÁLCOOL NO ORGANISMO.....	29
1.2 METABOLISMO DO ÁLCOOL.....	29
1.3 PADRÕES DE CONSUMO: BINGE ALCOÓLICO.....	31
1.4 ÁLCOOL E ESTRESSE OXIDATIVO.....	33
1.5 ÁLCOOL E NEUROINFLAMAÇÃO.....	34
1.6 ÁLCOOL E NEUROTRANSMISSÃO.....	36
1.6.1 Sinalização colinérgica	36
1.7 PEIXE-ZEBRA COMO MODELO EXPERIMENTAL NA ÁREA BIOMÉDICA.....	39
1.8 MODULAÇÃO COMPORTAMENTAL NO PEIXE-ZEBRA.....	41
1.9 JUSTIFICATIVA.....	43
2 OBJETIVOS	44
2.1 OBJETIVO GERAL.....	44
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 ANIMAIS.....	45
3.2 GRUPOS.....	45
3.3 MODELO DE BINGE ALCOÓLICO: <i>WEEKLY-BINGE</i>	46
3.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	47
3.4.1 Parâmetros de estresse oxidativo	47
3.4.1.1 Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS).....	47
3.4.1.2 Oxidação de DCFH.....	47
3.4.1.3 Atividade da Superóxido dismutase (SOD).....	48
3.4.1.4 Atividade da Catalase (CAT).....	48
3.4.2 Neuroinflamatórios	48
3.4.2.1 Expressão Gênica (PCR Quantitativa em Tempo Real) para as citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-10.....	48
3.4.3 Parâmetros de avaliação do sistema colinérgico	49
3.4.3.1 Atividade da ChAT.....	49
3.4.3.2 Atividade da AChE.....	50
3.4.4 Dosagem de proteínas	50
3.5 TESTE COMPORTAMENTAL.....	50
3.5.1 Animais	50

3.5.2 Teste <i>Novel tank</i>	50
3.5.3 Parâmetros analisados	51
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
4 RESULTADOS	53
4.1 PARÂMETROS DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	53
4.2 PARÂMETROS NEUROINFLAMATÓRIOS.....	55
4.3 SISTEMA COLINÉRGICO.....	56
4.4 PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS.....	57
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXOS	83
ANEXO A - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 EFEITOS DO ÁLCOOL NO ORGANISMO

O álcool é uma substância psicoativa amplamente utilizada e seu consumo em excesso está relacionado com uma série de efeitos nocivos à saúde, destacando sua capacidade em promover alterações bioquímicas e fisiológicas no sistema nervoso central (SNC) acarretando em mudanças comportamentais e nas funções cognitivas (Esel, 2006). O consumo excessivo de álcool é considerado um problema de saúde pública de ordem mundial, classificado entre os cinco principais fatores de risco para doenças, incapacidades e mortalidade. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2014), em 2012, 3,3 milhões de mortes tiveram como causa atribuída o consumo de álcool, correspondendo a 5,9 % de todas as mortes naquele ano. O consumo de álcool está listado como fator de patogenia para mais de 200 tipos de condições e doenças na Classificação Internacional de Doenças (CID-10), destacando as doenças gastrointestinais e as doenças cardiovasculares (WHO, 2014). Quando consumido em excesso, o álcool está associado com muitas condições neuropsiquiátricas, como depressão, ansiedade, convulsões e dependência. O álcool ainda é apontado como um agente carcinogênico para uma série de tipos de cânceres (Shield et al., 2013). As consequências do consumo em excesso não se limitam apenas a quem está consumindo e a sua saúde. Além das consequências individuais, como danos fisiológicos, psicológicos e comportamentais, o consumo de álcool também pode ocasionar prejuízo a outras pessoas que não bebem, acarretando consequências para a sociedade, tais como acidentes de trânsito, violência e custos aos serviços de saúde (Rehm, 2011).

1.2 METABOLISMO DO ETANOL

A maior parte da absorção do álcool ocorre no trato gastrointestinal, ocorrendo por difusão passiva sem que haja um sistema de transporte. Devido suas características hidrofílica e lipofílica, o álcool é capaz de se difundir facilmente pelas membranas das células e pela barreira hematoencefálica, distribuindo-se de forma rápida pelos órgãos e tecidos através da corrente sanguínea. O cérebro e os pulmões por serem órgãos altamente vascularizados recebem doses iniciais de álcool mais rapidamente (Mullen, 1977).

Logo após o início da absorção do etanol no estômago e no intestino, vias de metabolização são responsáveis pela degradação do etanol produzindo seu principal metabólito, o acetaldeído. Cerca de 90 % do álcool consumido é oxidado pelo fígado, o que confere esta como a principal via de metabolização. Por assumir grande parte da oxidação do álcool, o fígado é o órgão que está mais suscetível aos efeitos tóxicos do consumo de bebidas alcoólicas (Maher, 1997). Além disso, a velocidade de oxidação do álcool e da sua eliminação é dependente de diversos fatores, dentre as quais a quantidade de álcool ingerido bem como a ativação das vias responsáveis pela sua degradação (Zakhari, 2006).

As vias oxidativas são catalisadas pelas enzimas álcool desidrogenase (ADH; EC 1.1.1.1), enzimas do citocromo P450 (CYP450; EC 1.14.14.1), e catalase (CAT) (EC 1.11.1.6), correspondendo as principais vias de metabolização do álcool (Figura 1). A ADH, principal enzima no processo de metabolização oxidativa do etanol e presente predominantemente nas células hepáticas, inicia o processo de metabolização no citosol das células formando o acetaldeído. Assim como a ADH, o sistema microsomal de oxidação do etanol (MEOS) composto por isoenzimas do CYP450 presentes nas células hepáticas e de outros tecidos, como o cérebro, metabolizam o etanol em acetaldeído (Zimatkin et al., 2006). A ADH metaboliza o álcool reduzindo a coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) em NADH e o CYP450 oxida a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) em NADP^+ (Riveros-Rosas et al., 1997). Outra via de oxidação do álcool é realizada pela catalase, enzima que está presente nos peroxissomas. Esta via é considerada como a menor via de metabolização do álcool e assim como nos outros processos de oxidação, ocorre a formação de acetaldeído. Este aldeído em determinadas concentrações apresenta importante papel na indução de toxicidade, sendo responsável por uma série de efeitos deletérios aos sistemas biológicos, dentre os quais o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio, capacidade de formação de aductos com estruturas celulares, bem como ocasionar o desequilíbrio do potencial redox das células (Albano et al., 1988; Lovinger et al., 1989; Pushpakiran et al., 2005).

Uma vez formado, o acetaldeído é rapidamente metabolizado em acetato pela família de isoenzima acetaldeído desidrogenase (ADHL; EC 1.2.1.3). Este processo ocorre dentro das mitocôndrias, onde o acetaldeído é oxidado em acetato com o auxílio do cofator NAD^+ ,

gerando também como outro produto final o NADH. Grande parte do acetato formado segue para corrente sanguínea e é oxidado em dióxido de carbono ou metabolizado em Acetil-CoA (Israel et al., 1994).

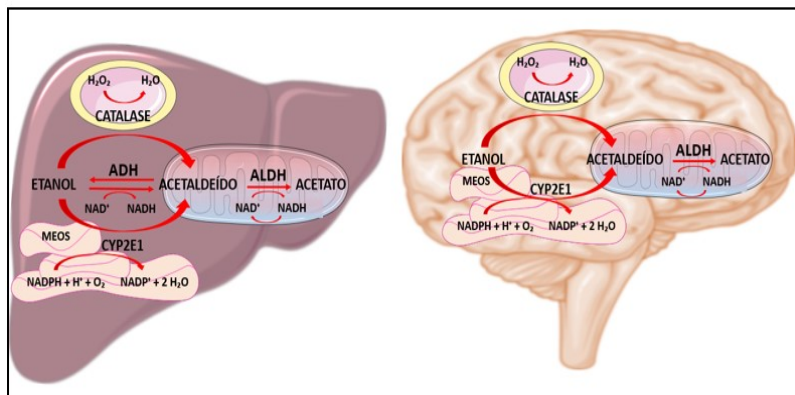


Figura 1: Representação do metabolismo hepático e cerebral do etanol. No hepatócito, o etanol é oxidado a acetaldeído por três vias metabólicas: pela via da enzima álcool desidrogenase (ADH) no citosol, utilizando o cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) que é reduzido a NADH; pela via enzima catalase nos peroxissomos, onde o etanol doa elétrons reduzindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O); e pela via sistema microsomal de oxidação do etanol (MEOS) no retículo endoplasmático liso, através do citocromo P450 (isoforma CYP2E1) e seu cofator fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida adenina (NADPH). Posteriormente, o acetaldeído é oxidado a acetato pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH) presente na mitocôndria. A metabolização do etanol nos neurônios é semelhante a que ocorre nos hepatócitos, porém, as principais vias são as da catalase e CYP2E1. Fonte: Berteli, 2017.

1.3 PADRÕES DE CONSUMO: BINGE ALCOÓLICO

O álcool é capaz de causar diferentes efeitos sobre o SNC, podendo atuar como um agente excitatório ou depressor conforme a via de neurotransmissão afetada. Sentimentos como felicidade, euforia, relaxamento, atenuação do estresse e ansiedade são algumas das alterações comportamentais resultantes do seu consumo (Gilman et al, 2008). Além disso, acredita-se que o álcool ative os centros de prazer e recompensa no cérebro ao desencadear a liberação de neurotransmissores como a dopamina e serotonina (Charlet et al., 2013). Os efeitos e os danos do consumo de álcool estão relacionados com os

padrões de consumo, que variam conforme a quantidade ingerida, o número de episódios e o período de tempo de ingestão (Paton, 2005).

Os padrões de consumo de bebidas alcóolicas são definidos conforme os diferentes comportamentos de consumo, sendo que na ingestão abusiva de álcool um padrão se destaca, o binge alcóolico (do inglês, *binge drinking*) (Courtney e Polich, 2009). Este padrão foi inicialmente definido por episódios de consumo excessivo de álcool seguidos por período de abstinência (Tomsovic, 1974). Mais recentemente foi definido como binge alcóolico o padrão de consumo de bebidas alcóolicas que leva a concentração de álcool no sangue em 0,8 g/dL ou mais, um nível facilmente atingido quando ingerido cinco doses ou mais de bebidas alcóolicas por homens e quatro doses ou mais por mulheres, em um período de duas horas (NIAAA, 2004A; Courtney e Polich, 2009). Neste padrão de consumo uma série de danos à saúde com diminuição na qualidade de vida são desencadeados, tais como hipertensão, danos ao fígado e meningite (Wen et al., 2012). O binge alcóolico também pode ocasionar alterações neurológicas, como alterações comportamentais e comprometimento das funções cognitivas (Ward et al., 2009a). Além dos danos à saúde, o binge alcóolico acarreta em uma série de custos sociais negativos, incluindo violência interpessoal, direção perigosa por embriaguez e perda de produtividade econômica (NIAAA, 2000).

O binge alcóolico também tem sido associado a problemas relacionados a dependência ao álcool, sendo os jovens e adolescentes mais propensos a danos neste quadro (Presley e Karmos, 1994; Wechsler et al., 2000; Dawson et al., 2004). Isto se dá pelo fato do cérebro ainda estar em desenvolvimento e ser mais sensível aos efeitos do álcool, especialmente a região do córtex pré-frontal (CPF) (Petersen et al., 1996; Spear, 2002). A alta quantidade de álcool ingerida durante os episódios de binge alcóolico pode exercer efeitos tóxicos causando danos no CPF e hipocampo, que são áreas responsáveis por processos neurocognitivos, como aprendizado, memória, habilidades verbais e espaciais. Os danos causados ao SNC podem ser imediatos ou a longo prazo, podendo contribuir para o ciclo e propagação de outros episódios de binge alcóolico (NIAAA, 2006; Wood, 2010). Embora o comportamento de binge alcóolico seja um padrão de consumo mais encontrado em adolescentes e capaz de gerar danos importantes a estes, este padrão de consumo também é encontrado na população adulta gerando danos que não são menos importantes daqueles vistos em

populações jovens (Viner e Taylor, 2007; Centers for Disease Control and Prevention, 2010).

Para o entendimento dos mecanismos relacionados aos danos induzidos pelo binge alcoólico, estudos vêm utilizando protocolos experimentais capazes de mimetizar em modelos animais este padrão de consumo. Os estudos com roedores têm demonstrado que o binge alcoólico prejudica a extinção de respostas ao medo através de mudanças morfológicas nos neurônios piramidais do córtex pré-frontal medial (Holmes et al., 2012). Além disso, foi demonstrado que o binge alcoólico pode comprometer a plasticidade sináptica nas áreas pré-frontais do encéfalo (Kroener et al., 2012) e promove alterações nos níveis de proteínas sinápticas e mielina, além de disfunções cognitivas a longo prazo (Montesinos et al., 2015). Diferentes sistemas de neurotransmissão podem sofrer disfunção no consumo intermitente de doses elevadas de etanol, tais como os sistemas glutamatérgico, GABAérgico, dopaminérgico, serotoninérgico e também sobre sistema opióide. As disfunções nesses sistemas podem causar alterações comportamentais e neurofisiológicas (Ward et al., 2009a).

1.4 ÁLCOOL E ESTRESSE OXIDATIVO

Espécies reativas são produtos naturais gerados por muitas reações e em múltiplas regiões da célula. Por possuírem uma alta reatividade com outras moléculas, as espécies reativas podem interagir com inúmeras macromoléculas e causar danos nas estruturas celulares (Birben et al., 2012). Dentre as espécies reativas produzidas, destacam-se as espécies reativas de oxigênio (EROs). O desequilíbrio entre a produção de EROs e o sistema antioxidante, sistema formado por componentes que interagem com as espécies reativas e as convertem em produtos menos danosos, podem estabelecer o estado de estresse oxidativo (Palipoch e Koohmin, 2015).

Fontes exógenas, como radiação, cigarro e álcool podem estabelecer uma produção em excesso de EROs e causar danos ao organismo. O álcool pode induzir a produção de EROs por uma série de mecanismos, principalmente como produto proveniente do seu metabolismo (Zakhari, 2006; Das e Vasudevan, 2007). A metabolização do etanol pelas enzimas ADH, CYP450 e CAT são vias produtoras de grandes quantidades de EROs, principalmente do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Wu et al., 2006). No consumo de álcool a alteração da razão entre NADH/NAD⁺ na célula

hepática demonstra ser o principal mecanismo de produção das EROs. O NADH produzido em excesso no citosol é transportado para mitocôndria, aumentando a oferta energética e consequentemente a produção de EROs pelo complexo respiratório mitocondrial. Além das vias de metabolização do etanol, o processo de metabolização do acetaldeído pela ADHL também produz relevantes quantidades EROs (Haroah et al, 2008). A produção em excesso de EROs provenientes de ambas as vias citadas podem ocasionar uma série de danos celulares, como a peroxidação lipídica, danos as proteínas e DNA, alteração da função mitocondrial, ativação da expressão e produção de citocinas e consequentemente a ativação de vias pró-apoptóticas (Hoek e Pastorino, 2002; Koch et al., 2004; García-Suástegui et al., 2017).

Os danos causados pelo estresse oxidativo estabelecido no consumo de álcool não se limitam apenas ao fígado. Assim como as células hepáticas, os neurônios possuem a ADH e enzimas do CYP450, entretanto em níveis menores que o fígado. Das enzimas do CPY450, a CYP2E1 (EC 1.14.13.n7) é a enzima que está diretamente envolvida no metabolismo do etanol no SNC (Zimatkin et al., 2006). Como no metabolismo hepático do etanol, células do SNC tornam-se vulneráveis aos danos do estresse oxidativo uma vez que os neurônios também são capazes de metabolizar o etanol e consequentemente formar EROs. Haorah et al (2008), demonstraram que as enzimas ADH e CYP2E1 são expressas em neurônios humanos e o etanol é capaz de causar dano oxidativo as mesmas células ao produzir EROs. A exacerbação da produção de EROs é capaz de estabelecer o estresse oxidativo no SNC, deixando as células suscetíveis a danos, como a peroxidação lipídica e aos efeitos da ativação de vias inflamatórias. O processo neuroinflamatório pode ser iniciado e danos aos neurônios podem levar à neurodegeneração, o que pode estar associado aos mecanismos de desordens neurológicas causadas pelo consumo do álcool.

1.5 ÁLCOOL E NEUROINFLAMAÇÃO

Os efeitos nocivos do etanol sobre o SNC estão relacionados com uma série complexa de mecanismos, onde vias de neurotransmissão podem ser moduladas pelo aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e pelo aumento da produção de espécies reativas (Koob e Volkow, 2010; Cui et al., 2014). Estes mecanismos podem contribuir para morte neuronal e iniciar um processo de neurodegeneração, como já descrito na literatura (Oberbier et al., 2002; Kelso et al., 2011).

O dano ao cérebro ocasionado no consumo de álcool se deve em parte pela exposição ao próprio etanol bem como aos bioprodutos formados na sua metabolização, como o acetaldeído, acetato e espécies reativas. Outro mecanismo apontado como causa no dano cerebral pelo álcool, é a ativação de vias inflamatórias periféricas e amplificação da resposta inflamatória nas células do SNC (González-Reimers et al., 2014). Devido ao aumento da permeabilidade intestinal que ocorre no consumo de álcool, endotoxinas presentes no intestino seguem para o fígado pelo sistema porta e estimulam a produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) pelas células hepáticas. O TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias são liberadas na corrente sanguínea e podem de gerar uma resposta inflamatória em órgãos distantes, como o cérebro. A presença dessas citocinas no cérebro podem amplificar a resposta inflamatória ao induzir fatores transcrição pró-inflamatórios e consequentemente aumentar a produção local de citocinas (Vetreno et al, 2014). As citocinas ao chegarem no cérebro são capazes de ativar a microglia, a principal célula do sistema imune intato do SNC (Chastain e Sarkar, 2014). Quando ativada, a microglia é capaz de liberar uma variedade de mediadores neuroinflamatórios que poderão desempenhar efeitos de neuroproteção ou neurotóxico (Czirr e Wyss-Coray, 2012).

Dentre os mediadores inflamatórios liberados pela microglia estão as citocinas, quimiocinas, proteínas do complemento, EROs e oxido nítrico (Hanisch e Kattenmann, 2007). No estágio inicial da resposta imune inata, o TNF- α e da interleucina IL-1 beta (IL-1 β) são as duas principais citocinas pró-inflamatórias produzidas pela microglia. Estas citocinas de início exercem um papel neuroprotetor aumentando a secreção de neurotrofinas e promovendo a maturação dos oligodendrócitos. No entanto, quando a microglia torna-se superativada, ela é responsável pela liberação de inúmeros outros fatores pró-inflamatórios, como as EROs, que também podem mediar a neuroinflamação (Cui et al., 2014). Ao atingirem o cérebro as citocinas podem causar danos as células dos SNC ao ativar o sistema neuroimune, que por sua vez responde ampliando mecanismos inflamatórios, tais como: ativação de fatores de transcrição inflamatórios, aumento da produção de citocinas, inibição de fatores neurotróficos, bem como a indução na produção espécies reativas (Capuron e Miller, 2011).

Estudos de exposição ao álcool utilizando modelo animal e em estudos em humanos *post-mortem* com cérebro de alcoolistas apontam o álcool como um importante agente modulador do sistema neuroimune (Crews et al., 2015). Estudos com baixas e altas doses etanol

demonstraram a importante relação entre o etanol e a ativação de células pró-inflamatórias (Ward et al., 2009b, Marshall et al., 2013; Marshall et al., 2016). Crews e et al (2006) demonstraram que a determinação do estado pró ou anti-inflamatório dos monócitos dependerá do tempo de exposição ao etanol bem como na complexidade de sinais co-estimuladores.

Componentes inflamatórios podem ainda comprometer a integridade das sinapses no SNC ao modificar cascatas intracelulares, alterando proteínas pré e pós-sinápticas, sendo que estas alterações podem gerar uma série de danos aos sistemas de neurotransmissão podendo ocasionar em desordens neuropsiquiátricas (Rao et al., 2012). Dentre as vias de neurotransmissão que sofrem regulação pelos componentes do sistema neuroinflamatório, destacamos o sistema colinérgico, sendo que o distúrbio entre os dois sistemas pode causar mudanças na sinalização neural (Ofek e Soreq, 2013). Foi evidenciado que alterações dos níveis de enzimas componentes do sistema colinérgico podem atuar na regulação da produção da interleucina pró-inflamatória IL-1 β , bem como o desequilíbrio dessas enzimas podem ativar a produção de IL-1 β e gerar danos ao SNC (Li et al., 2000).

1.6 ÁLCOOL E NEUROTRANSMISSÃO

O etanol pode afetar o SNC interferindo nos sistemas de neurotransmissão, causando um desequilíbrio nos sistemas excitatórios e inibitórios em diferentes padrões de consumo. (De Witte, 2004; Costardi et al., 2015). Dentre seus efeitos modulatórios no SNC, o etanol atua por modificar vias de transdução de sinal, o qual influencia diversos sistemas de neurotransmissão, como o glutamatérgico, o GABAérgico e o adenosinérgico, por exemplo (Deitrich, 2004; Quertemont et al., 2005; Sharma et al., 2010). Além das vias citadas, destaca-se ainda o sistema colinérgico como uma via suscetível a alterações pelo álcool (Arendt et al., 1988; Rico et al., 2007; Vetreno et al., 2014).

1.6.1 Sinalização Colinérgica

A acetilcolina (ACh) é um clássico neurotransmissor do sistema colinérgico que desempenha diversas funções no sistema nervoso central e periférico, sendo sintetizada pela enzima Colina Acetiltransferase (ChAT) (EC 2.3.1.6) e armazenada em vesículas. A exocitose vesicular acontece com auxílio do Transportador Vesicular de Acetilcolina

(vAChT), onde a ACh é liberada na fenda sináptica e é rapidamente degradada pela enzima Acetilcolintransferase (AChE) (E.C 3.1.1.7) em acetato e colina (Silva, 2008) (Figura 2). Grande parte da colina resultante é captada pelo terminal do axônio colinérgico pelo transportador de colina (CHT) e reutilizada na síntese de nova ACh (Mesulam et al., 2002).

A ChAT é uma enzima restrita a estruturas pré-sinápticas, sendo assim, o marcador mais adequado para identificação de neurônios colinérgicos nos sistema nervoso central e periférico (Silva, 2008; Siegel, 2012). No entanto, a AChE pode ser usada como um indício da função colinérgica, e mudanças na atividade da enzima podem indicar alterações na disponibilidade de ACh e de seus receptores (Fernandes e Hodges-Savola, 1992). A acetilcolina é um neurotransmissor de fundamental importância nas funções desempenhadas pelo córtex cerebral. Esse neurotransmissor tem sido associado com as funções cognitivas, como aprendizado e memória, no processamento das funções sensoriais e no controle do fluxo sanguíneo cerebral (Scremim et al., 1997). Os efeitos intracelulares da acetilcolina são mediados pela ativação de receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) e muscarínicos (Burgen, 1995). Estas duas classes são divididas em função das afinidades por agentes que mimetizam a ação da acetilcolina (Tinsley et al., 2004).

Os receptores nicotínicos são ionotrópicos, reconhecem a acetilcolina e são sensíveis a nicotina (Albuquerque et al., 2009). Os receptores nicotínicos estão ligados a canais catiônicos e possuem uma estrutura pentamérica (McKay e Placzek, 2007). Estes receptores pertencem a uma família heterogênea que consiste em diferentes subtipos, os quais formam combinações homoméricas ou heteroméricas a partir de 12 diferentes subunidades ($\alpha 2$ - $\alpha 10$, $\beta 2$ - $\beta 4$) (Gotti e Clementi, 2004). Os receptores muscarínicos são metabotrópicos e apresentam cinco subtipos (M1-M5) que foram clonados e identificados farmacologicamente. Os receptores M1, M3 e M5 estão acoplados a uma proteína Gq/11 e alteram a atividade celular pela estimulação da fosfolipase C e pela geração do segundo mensageiro IP3, o qual induz a liberação de cálcio intracelular e diacilglicerol (DAG). Contudo, os receptores M2 e M4 estão acoplados a uma proteína Gi que induz sua reposta via inibição da adenilato ciclase (Caulfield e Birdsall, 1998; Uchiyama e Chess-Williams, 2004). Os nAChRs estão distribuídos ao longo de todo SNC e SNP, sendo expressos em neurônios e células não neuronais, como microglia, astrócitos, oligodendróctios e células

epiteliais. Estes receptores possuem importante papel em múltiplos processos biológicos, como memória, aprendizado, locomoção, atenção e ansiedade. (Egea et al., 2015).

Um dos sistemas de neurotransmissão afetados no consumo de etanol é o colinérgico. Estudos em roedores tratados cronicamente com álcool demonstraram a perda de neurônios colinérgicos em regiões específicas do cérebro, a redução do conteúdo de ACh e diminuição da atividade da ChAT e AChE, enzimas responsáveis pela transmissão colinérgica (Arendt et al., 1988). Resultados positivos para diminuição da atividade da ChAT foram encontrados em estudos com roedores jovens submetidos a um modelo de intermitente de exposição ao álcool, entretanto quando o mesmo modelo foi aplicado em animais adultos, não houve diminuição da atividade da ChAT. Em contraste, animais adultos submetidos a um modelo de exposição crônica apresentaram uma redução na população de células colinérgicas no prosencéfalo basal (Vetreno et al., 2014). A diminuição da contagem de células colinérgicas no prosencéfalo basal foi significativamente correlacionada com um comportamento menos ansioso em roedores jovens expostos cronicamente ao etanol na forma de vapor (Ehlers et al., 2011). A diminuição da expressão de genes responsáveis pela ChAT e dos receptores colinérgicos muscarínicos e nicotínicos também foi encontrada em roedores jovens e adultos expostos a um modelo de binge alcóolico (Coleman et al., 2011).

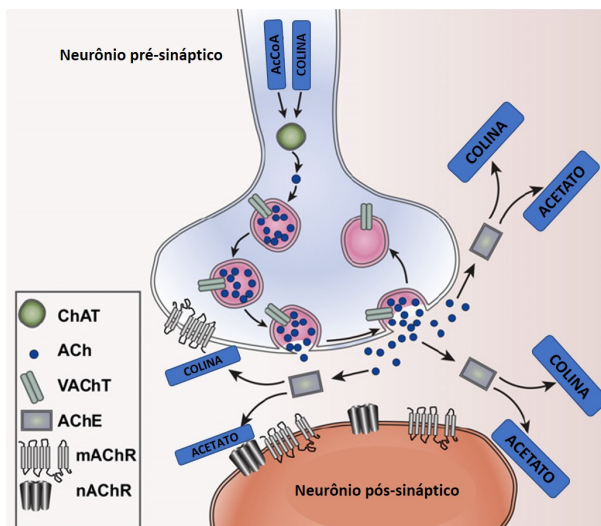


Figura 4: Representação da Sinalização Colinérgica. A Acetilcolina (ACh) é sintetizada pela enzima Colina Acetiltransferase (ChAT) no neurônio pré-sináptico e armazenada em vesículas específicas. Com auxílio do Transportador Vesicular de Acetilcolina (vAChT) a ACh é liberada na fenda, onde poderá se ligar em Receptores de Acetilcolina Nicotínico (nAChR) ou Muscarínicos (mAChR). Uma vez liberada na fenda sináptica, a ACh excedente é rapidamente degradada pela enzima Acetilcolinesterase (AChE) em colina e acetato. Fonte: Adaptado de Ofek e Soreq, (2013).

1.7 PEIXE-ZEBRA COMO MODELO EXPERIMENTAL NA ÁREA BIOMÉDICA

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um pequeno teleosteo (3 a 4 cm) de água doce pertencente à família Cyprinidae. Tem sido amplamente utilizado como modelo experimental em diversas áreas do conhecimento, tais como: genética, teratologia, biologia do desenvolvimento, comportamento e toxicologia (Vascotto et al., 1997). Este peixe apresenta características favoráveis que complementam os modelos experimentais existentes, tais como: pequeno espaço requerido para manutenção, baixo custo por animal, rápido desenvolvimento, grande prole, embriões translúcidos e suscetíveis à manipulação e microinjeção (Lele e Krone, 1996). Além disso, grandes segmentos dos cromossomos do peixe-zebra estão em sintonia com os cromossomos humanos e dos camundongos e muitos genes apresentam um alto grau de similaridade, quando comparados em sua sequência (Barbazuk et al.,

2000). O Instituto Sanger iniciou em 2001 o sequenciamento do genoma total do peixe-zebra, observando uma homologia de aproximadamente 70-80% com o genoma humano (Stern e Zon, 2003) e o seu genoma mitocondrial já está sequenciado, servindo de base para estudos filogenéticos (Broughton et al., 2001).

Pelo fato de ser um vertebrado que apresenta características relevantes, o peixe-zebra vem se tornando um modelo animal complementar dos roedores, principalmente para estudos translacionais em larga escala. Esta espécie tem sido amplamente utilizada como modelo experimental para o estudo das bases moleculares da neurobiologia, auxiliando na identificação de genes envolvidos na formação de circuitos neuronais, no comportamento e nos mecanismos envolvidos na neuropatogênese (Barbazuk et al., 2000; Goldsmith, 2004; Guo, 2004; Gerlai et al., 2006; Lieschke e Currie, 2007; Ebarasi et al., 2011). Outro aspecto importante que contribui para a utilização deste modelo é o fato de que esta espécie absorve os componentes diretamente da água pelas suas brânquias, acumulando-os em diferentes tecidos, dentre os quais o SNC (Groessel e Wood, 2002; Blank et al., 2009; Froehlicher et al., 2000; Yang et al., 2009). Diversos sistemas de neurotransmissão amplamente estudados em mamíferos já foram identificados e descritos em peixe-zebra, tais como: colinérgico (Behra et al., 2002), dopaminérgico (Boehmler et al., 2004), GABAérgico (Kim et al., 2004), glutamatérgico (Edwards e Michel, 2002), histaminérgico (Kaslin e Panula, 2001), serotoninérgico (Rink e Guo, 2004) e purinérgico (Kucenas et al., 2003; Rico et al., 2003; Senger et al., 2004; Rosemberg et al., 2010a; Savio et al., 2012; Vuaden et al., 2016). Especificamente ao sistema colinérgico do peixe-zebra, Arenzana et al., (2005) estudou pela primeira vez parâmetros através de análise histoquímica e imunohistoquímica em SNC e retina (Clemente et al., 2004). O gene da AChE já foi clonado e sequenciado, e sua atividade enzimática já foi detectada em cérebro (Bertrand, 2001). Além disso, subunidades de receptores muscarínicos e nicotínicos também são expressos nesta espécie (Zirger, et al., 2003).

Com relação à exposição de etanol em peixe-zebra, dentre as alterações neuroquímicas observadas, podem ser citadas modificações nos níveis cerebrais de dopamina, serotonina, regulação dos níveis de AMP cíclico e da via de sinalização das cinases reguladas por sinal extracelular (ERKs) (Chatterjee e Gerlai, 2009; Peng et al., 2009). Estudos demonstram que a atividade e a expressão de enzimas responsáveis pela hidrólise de nucleotídeos extracelulares, bem como

das enzimas adenosina deaminase e AChE são alteradas em peixe-zebra após a exposição ao etanol (Rico et al. 2007; Rico et al., 2008; Rico et al., 2011). Rosemberg et al (2012) observaram que a exposição aguda do peixe-zebra ao etanol durante diferentes tempos promove aumento nos níveis cerebrais desse composto, o que pode estar relacionado com as respostas comportamentais promovidas pelo álcool no comportamento tipo ansiedade, depressor/sedativo e da preferência condicionada ao etanol previamente descritos (Mathur e Guo, 2011; Mathur et al., 2011). Apesar desses trabalhos que descrevem os efeitos da exposição aguda e crônica ao etanol em peixe-zebra, pouco se sabe sobre as alterações comportamentais induzidas pela exposição intermitente de grandes quantidades de álcool nesse modelo animal. Atualmente, apenas um trabalho encontra-se disponível na literatura com um modelo que mimetiza o binge alcóolico em peixe-zebra adulto. Neste estudo, alterações comportamentais pelo teste *Scototaxis* (preferência claro/escuro), foram encontradas apenas em animais tratados cronicamente, sendo que os animais submetidos ao modelo intermitente de etanol não apresentaram diferença comportamental (Holcombe et al., 2013). Entretanto, há uma variedade de paradigmas comportamentais em peixe-zebra ainda não explorados no estudo dos efeitos da exposição intermitente de etanol, sendo que diferentes modelos e abordagens podem contribuir para a melhor compreensão dos efeitos do álcool sobre o comportamento.

1.8 MODULAÇÃO COMPORTAMENTAL EM PEIXE-ZEBRA

Um grande desafio da neurociência é compreender como a atividade cerebral dá origem ao comportamento e suas desordens. A compreensão completa das desordens neurocomportamentais podem ser alcançadas por diferentes abordagens, como por exemplo, na utilização de modelos. Os modelos são utilizados para representar problemas complexos em uma forma simplificada, sendo que na neurociência o conceito de modelo pode se estender e incluir mais especificamente os modelos biológicos (Orger e de Polavieja, 2017).

O valor de um modelo biológico é dito por sua validade e por este motivo, estudos das desordens comportamentais buscam modelos com um comportamento natural combinado ao controle rigoroso dos parâmetros experimentais a fim de compreender a fisiologia e o comportamento (Orger e de Polavieja, 2017). Modelos biológicos em roedores são os mais bem-sucedidos na neurociência, entretanto a busca

por novas abordagens na pesquisa da neurociência comportamental tem implementado modelos alternativos (Levin e Cerutti, 2009).

Estudos em peixes, mais especificamente em peixes-zebras, emergiram recentemente como um novo modelo para o estudo dos mecanismos comportamentais e moleculares relacionados as desordens no cérebro. Estão entre as vantagens em utilizar o peixe-zebra como um organismo modelo a alta homologia genética e fisiológica comparada os mamíferos, bem como o compartilhamento de mesmos sistemas de neurotransmissão no cérebro. Estas características fazem com que o peixe-zebra seja considerado uma forte evidência clínica, apoiando ainda mais sua validade e caráter translacional (Stewart et al., 2014).

A ansiedade, um transtorno comportamental complexo e multidimensional, vem sendo estudada na neurociência a fim de compreender como os circuitos neuronais e outros mecanismos potencialmente modulam este comportamento. Por compartilhar das mesmas vias e mecanismos relacionados a ansiedade em humanos, o peixe-zebra tornou-se um popular organismo experimental no estudo da ansiedade ao demonstrar fortes respostas a este comportamento (Sterling et al., 2015; Kalueff et al., 2017).

O estudo da ansiedade em peixe-zebra se dá principalmente pela análise do comportamento exploratório do animal. Quando o peixe-zebra é colocado em um novo ambiente, ele tende a nadar para o fundo do ambiente, permanecendo nesta região por algum período de tempo. Alguns minutos após, o animal gradualmente procura explorar o novo ambiente emergindo aos níveis superiores (Singer et al., 2016). O teste mais popular para avaliar a ansiedade em peixe-zebra é *Novel tank*, um modelo comparado ao teste de campo aberto (*Open field*) aplicado em roedores. No *Novel tank* o comportamento ansioso é refletido na redução da exploração do peixe quando introduzido em um novo ambiente, seja pela maior latência em chegar ao topo, diminuição no número de entradas ao topo ou por frequentemente apresentar um estado de *freezing* no fundo do tanque (Stewart et al., 2012; Stewart et al., 2014).

O etanol tem o efeito de modular o comportamento quando consumido em diferentes padrões e doses, o que pode estar associado com o seu efeito sobre os sistemas de neurotransmissão no cérebro. O peixe-zebra tem sido cada vez mais utilizado como um modelo no estudo neurocomportamental dos efeitos do etanol. A modulação de uma série de comportamentos em peixes-zebra expostos ao etanol de forma crônica e aguda, foi demonstrada em vários estudos (Gerlai et al.,

2000; Dlugos e Rabin, 2003; Spence et al., 2008). Mais especificamente, Gerlai et al (2000, 2006), buscaram compreender a modulação da ansiedade, onde evidenciaram o efeito ansiolítico do etanol em peixes-zebra expostos a altas doses. Os mesmos trabalhos demonstraram um potencial adaptativo do peixe-zebra aos efeitos do álcool quando tratados cronicamente. Diante a importância dos efeitos do álcool sobre o comportamento e da validade dos testes de ansiedade em peixe-zebra, esta dissertação buscou avaliar os efeitos do etanol em peixes-zebra submetidos a um modelo de binge alcoólico.

1.9 JUSTIFICATIVA

O álcool é capaz de causar uma série de danos em tecidos e órgãos, destacando os seus efeitos nocivos ao cérebro ao modular uma série de mecanismos e vias, como alterações nos sistemas de neurotransmissão, ativação de vias pró-oxidantes e indução do sistema pró-inflamatório. A compreensão desses mecanismos é de grande importância para determinar os processos fisiopatológicos envolvidos nos efeitos deletérios do consumo do álcool no cérebro. A utilização de modelos animais, como o peixe-zebra, é de grande relevância nos estudos do impacto do álcool sobre os sistemas, bem como na busca por alvos farmacêuticos com efeito neuroprotetor. Considerando o consumo significativo de álcool por parte da população e seu efeito deletério sobre o organismo, neste trabalho buscamos compreender como o etanol pode impactar parâmetros neuroquímicos, inflamatórios e oxidativos em peixes-zebra submetidos a um modelo de exposição ao etanol que mimetiza o binge alcoólico, o *weekly-binge*. A avaliação desses parâmetros e compreensão de seus mecanismos em um modelo experimental em peixe-zebra é um passo para o entendimento dos efeitos neurotóxicos do *weekly-binge*, bem como fomenta o desenvolvimento de estudos mais abrangentes visando estratégias para atenuação dos efeitos danosos promovidos pelo consumo de álcool.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição *weekly-binge* ao etanol em parâmetros bioquímicos e comportamentais em peixe-zebra.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar os efeitos da exposição *weekly-binge* ao etanol em parâmetros de estresse oxidativo, tais como, níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS), oxidação de 2,7-diclorofluoresceína reduzido (DCFH) e atividade das enzimas antioxidantes SOD e catalase em tecido cerebral de peixe-zebra;

- Avaliar os efeitos da exposição *weekly-binge* ao etanol na expressão gênica de IL-1 β , TNF α e IL-10 em tecido cerebral de peixes-zebra;

- Determinar os efeitos da exposição *weekly-binge* ao etanol sobre a atividade das enzimas ChAT e AChE em tecido cerebral de peixes-zebra;

- Avaliar os efeitos da exposição *weekly-binge* ao etanol sobre o comportamento exploratório de peixe-zebra.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

No presente trabalho foram utilizados peixes-zebra (*Danio rerio*) adultos (com aproximadamente quatro meses de idade) de ambos os sexos da linhagem heterogênea do fenótipo short-fin. Os animais foram obtidos através do biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e mantidos no Laboratório de Sinalização Neural e Psicofarmacologia, da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram mantidos em aquários de 20 litros com água de clorada, salinizada e continuamente aerada, com o número de 30 animais por aquário. A temperatura da água foi regulada em $28,5 \pm 1$ °C e os peixes foram mantidos em ciclo de claro-escuro de 14h/10h controlado por fotoperíodo (luzes acesas às 7h; luzes apagadas às 21h), sendo que as condições físico-químicas da água eram frequentemente analisadas. Os peixes eram alimentados duas vezes por dia com artêmias. Todos os procedimentos com a utilização de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense sob o protocolo 034/2017-1 (anexo A).

3.2 GRUPOS

Os grupos foram formados a partir de uma seleção aleatória dos animais. Neste trabalho utilizamos três grupos expostos ao etanol, sendo que a diferença entre eles foi o tempo de intervalo entre a última exposição ao etanol e os ensaios realizados. Os grupos expostos etanol serão chamados de grupo *weekly-binge*, sendo eles: grupo *weekly-binge* imediato (WB-I), grupo *weekly-binge* dois dias (WB-2), grupo *weekly-binge* nove dias (WB-9). Determina-se como grupo controle, para todos os ensaios, os animais que não foram expostos ao etanol em momento algum. Caracteriza-se o grupo WB-I os animais testados imediatamente após a última exposição ao álcool, grupo WB-2 os animais testados dois dias (48h) após à última exposição ao álcool e por fim o grupo WB-9 os animais testados 9 dias após a última exposição ao etanol. O número de animais utilizados variou para as análises bioquímicas e o teste comportamental. Para as análises bioquímicas utilizou-se o número de 30 animais por cada grupo, formando um N de seis amostras composta por um *pool* de cinco cérebros totais. Já para o teste comportamental, foram utilizados 12 animais por cada grupo testado.

3.3 MODELO DE BINGE ALCOÓLICO: *WEEKLY-BINGE*

Seguiu-se um protocolo adaptado de exposição excessiva e intermitente de etanol, chamado de *weekly-binge* (Figura 3). Este protocolo mimetiza o padrão de consumo binge alcóolico, conforme proposto por Holcombe et al (2013). Nesse modelo, os animais foram expostos ao etanol (1,4 % v/v) por 30 min, uma vez por semana por três semanas consecutivas. No período entre as exposições ao etanol os animais permaneceram no aquário habitat (sem etanol), sendo transferidos para o aquário experimento nos dias 1, 7 e 14, conforme a Figura 3.

Para obter as amostras para as análises bioquímicas os animais foram anestesiados pela técnica de crioanestesia e posteriormente o cérebro total foi extraído. Os animais do grupo WB-I foram eutanasiados imediatamente após o término da última exposição ao álcool, o grupo WB-2 após 48 horas e WB-9 nove dias após a última exposição. Para as análises bioquímicas utilizou-se um grupo controle sem exposição ao álcool. Os mesmos grupos, conforme caracterizado anteriormente foram analisados no teste comportamental. Para cada grupo teste analisado, utilizou-se um grupo controle diário.

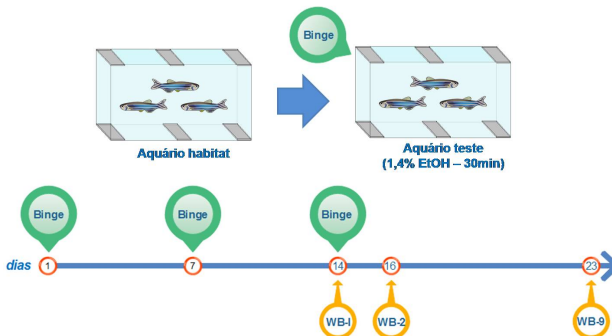


Figura 3: Protocolo experimental *weekly-binge* (adaptado) em peixe-zebra adulto (Holcombe et al., 2013). Os animais foram mantidos em seu respectivo aquário habitat (sem etanol) antes do experimento. Nos dias 1, 7 e 14 os animais foram transferidos para o aquário teste com etanol (1,4% v/v) durante 30 minutos. Após a exposição, os animais foram transferidos para um aquário intermediário com água, a fim de eliminar o etanol no animal e evitar contaminação do aquário habitat. Os grupos *weekly-binge* foram determinados conforme o tempo entre de exposição a última exposição ao etanol e os ensaios, sendo eles: grupo WB-I, testado imediatamente após a terceira exposição; grupo WB-2, testado 48h após a última exposição e grupo WB-9 testado após 9 dias da última exposição ao etanol. Fonte: elaborado pelo autor.

3.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.4.1 Parâmetros de estresse oxidativo

3.4.1.1 Níveis de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS)

Para determinação dos níveis de TBA-RS, os cérebros totais foram homogeneizados em tampão PBS gelado (pH 7,4). Logo após o homogeneizado foi precipitado por meio de uma reação ácida com ácido tricloroacético (TCA, Vetec®) a 10 % com sulfato de sódio adicionado ao sobrenadante na proporção 1:1 (v/v). Após centrifugação, o sobrenadante foi tratado com ácido tiobarbitúrico (TBA, Sigma-Aldrich® St. Louis, MO, EUA) 0,67 % na proporção de 1:1(v/v). A mistura foi levada a um banho fervente durante 2 horas e, após, resfriada em água à temperatura ambiente. A absorvância obtida através da coloração rósea resultante foi medida em espectrofotômetro a 532 nm. Concomitantemente, foi feita uma curva de calibração com 1,1,3,3-tetrametoxipropano, na qual todos os pontos foram tratados da mesma forma que as amostras. Os resultados foram expressos como nmol de TBA-RS.mg de proteína⁻¹ (Esterbauer e Cheeseman, 1990).

3.4.1.2 Oxidação de DCFH

A produção de espécies reativas em cérebro total de peixe-zebra submetidos a exposição crônica ao etanol, foi determinada de acordo com o método de LeBel et al. (1992), utilizando-se o diacetato de 2,7-diclorofluoresceína (DCF-DA). Às alíquotas de amostras (80 µg de proteína) previamente homogeneizadas, adicionou-se a forma diacetato do DCF, a qual é permeável à membrana celular, e essas alíquotas foram incubadas durante 30 min a 37 °C. No meio intracelular, esterases clivam o grupamento acetato do DCF-DA, gerando a forma reduzida DCFH. As espécies reativas presentes no meio oxidam o DCFH, produzindo o produto fluorescente 2',7'-diclofluoresceína (DCF). A fluorescência foi medida usando comprimentos de onda de 480 (excitação) e 535 nm (emissão). A curva de calibração foi realizada utilizando-se DCF padrão (0-10 µM) e os resultados estão expressos como pmol de DCF.mg de proteína⁻¹.

3.4.1.3 Atividade da Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD em cérebro total foi determinada de acordo com Bannister e Calabrese (1987). Primeiramente, foram realizadas leituras da auto-oxidação da adrenalina. Após, foram adicionados à amostra catalase 10 mM, tampão glicina 50 mM e adrenalina 60 mM, e ao branco foi adicionada adrenalina 60 mM. A atividade enzimática foi determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente em 480 nm à temperatura ambiente. A atividade da enzima foi expressa em U.mg de proteína⁻¹ (unidade de atividade da SOD por mg de proteína).

3.4.1.4 Atividade da Catalase (CAT)

Esta atividade enzimática da catalase em cérebro total foi determinada através do método de Aebi (1984). À amostra previamente homogeneizada, foi adicionado Triton 0,1 % seguido de agitação. Esta mistura foi conservada em gelo durante 15 minutos. Ao tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, foi adicionado H₂O₂ 30% (v/v). Este meio foi colocado em cubeta de quartzo e o aparelho estabilizado contra um branco corrido separadamente de tampão fosfato. Após adição da amostra, foi realizada a leitura da queda da absorvância do H₂O₂ a 240 nm, à temperatura ambiente, durante 180 segundos. Para o cálculo, utilizou-se o coeficiente de extinção do H₂O₂ de 43,6 mM⁻¹cm⁻¹. Os resultados da atividade enzimática estão expressos em U.mg de proteína⁻¹ (unidade de atividade da catalase por mg de proteína).

3.4.2 Parâmetros neuroinflamatórios

3.4.2.1 Expressão Gênica (PCR Quantitativa em Tempo Real) para as citocinas inflamatórias *TNF-α*, *IL-1β* e *IL-10*

Para este protocolo, os cérebros coletados foram armazenados em freezer -80 °C com a solução estabilizadora RNeasy® Solution (ThermoFisher Scientific®, EUA). O ácido ribonucleico (RNA) total foi extraído utilizando-se o reagente RNeasy Mini Kit (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Dois microgramas de RNA foram convertidos a cDNA utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, EUA). A expressão gênica de genes envolvidos na inflamação foi avaliada utilizando sondas TaqMan

(Life Technologies, EUA) (Tabela 1). As diferenças na expressão gênica foram calculadas utilizando *ef-1 α* como controle interno (Baldo et al., 2011). Como grupo calibrador foi utilizado cérebro de animais do grupo control ($n = 6$).

Tabela 1: ID das sondas TaqMan (Life Technologies, USA) para os genes analisados neste estudo.

Gene Symbol	Assay ID
<i>tnf-α</i>	dr03126848
<i>il-1b</i>	dr03114368
<i>il-10</i>	dr03103209
<i>ef-1α</i>	dr03432748

3.4.3 Parâmetros de avaliação do sistema colinérgico

3.4.3.1 Atividade da ChAT

A atividade da enzima ChAT foi determinada conforme Chao e Wolfgram (1973) em cérebro total. As amostras foram incubadas no meio de reação contendo tampão fosfato de sódio 0,5 M (pH 7,2), 6,2 mM de acetil-CoA, 1 M de cloreto de colina, 0,76 mM de sulfato de neostigmina 0,76 mM, 3 M de cloreto de sódio e 1,1 mM de ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA). Após, foi adicionado 1 mM de 4,4'-ditiodipiridina (4-PDS) e a absorvância foi lida a 324 nm por 20 minutos em um leitor de microplaca SpectraMax® (Molecular Devices® Califórnia, USA). A atividade foi medida pela formação do conjugado 4-tiopiridona (4-TP), produto resultante da ligação do CoA com o 4-PDS. Os resultados foram calculados utilizando-se o coeficiente de extinção molar do 4-TP, $1,98 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, e estão expressos em $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ de proteína⁻¹. A proteína total foi avaliada pelo método de Bradford (1976).

3.4.3.2 Atividade da AChE

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

3.4.4 Dosagem de proteínas

A quantificação de proteínas totais nas amostras foi realizada através do método de Lowry et al. (1951), para realização das análises dos parâmetros de estresse oxidativo, e o método de Bradford (1976) para as demais análises. Como padrão foi utilizado albumina sérica bovina.

3.5 TESTE COMPORTAMENTAL

3.5.1 Animais

Os animais analisados no teste comportamental foram expostos ao etanol pelo mesmo modelo de exposição *weekly-binge*. Os grupos foram compostos por 12 animais adultos, de ambos os sexos e selecionados de forma aleatória. A análise comportamental ocorreu em diferentes dias para cada grupo, sendo que para cada grupo *weekly-binge* (exposto ao álcool) utilizou-se um controle diário, sendo que no final do experimento obtivemos quatro grupos controle.

3.5.2 Teste *Novel tank*

O teste comportamental *Novel tank* foi realizado durante o mesmo período do dia para todos os grupos (entre as 9:00 e 16:00). A cada dia um grupo tratado com etanol, conforme o modelo *weekly-binge*, foi transferido para o aparato teste e teve sua atividade comportamental gravada. Cada animal foi transferido de forma cuidadosa para o aparato e testado individualmente. Da mesma forma que no estudo de Rosemberg et al (2012), o aparato teste consistiu em

um aquário de vidro trapezoidal (23,9 cm fundo, 28,9 cm topo e 15,1 cm altura) preenchido com 1,5 mL de água proveniente do respectivo aquário habitat (Figura 4A). A fim de evitar movimentos que pudessem perturbar o animal e também para melhorar a qualidade das gravações, folhas de papel na cor amarela foram colocados ao redor do aquário em uma distância de 10 cm.

Virtualmente, três áreas foram delimitadas de forma horizontal, formando as zonas: fundo, meio e topo (Figura 4B), conforme previamente determinado (Rosemberg et al., 2011). Uma câmera foi colocada na frente do aquário a uma distância de 30 cm e uma lâmpada foi ajustada acima do aquário a fim de melhorar o contraste entre animal e o fundo do aquário. A câmera foi conectada em um computador para gravação dos vídeos e a atividade comportamental foi analisada utilizando um software de *videotracking* apropriado (ANY-maze®, Stoelting CO, USA). O tempo de gravação foi de 6 minutos para todos os 12 animais que formaram cada um dos grupos *weekly-binge* e os controles. A cada três animais testados, a água presente no aquário teste foi substituída, sendo que todos os peixes foram manipulados pela mesma pessoa durante o teste comportamental.

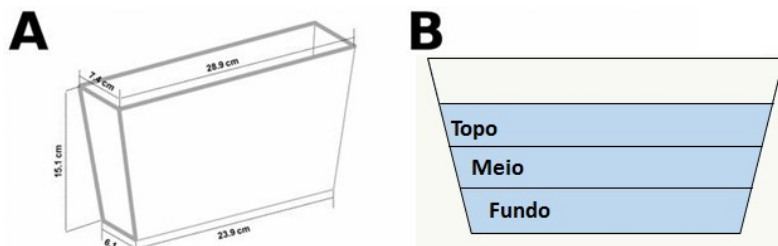


Figura 4: Figura representativa das dimensões e zonas determinadas no aparato utilizado no teste *Novel tank*. Dimensões do aquário utilizado para o teste comportamental. O aquário foi preenchido com 1,5L de água proveniente do respectivo aquário habitat de cada grupo (A). No *software* utilizado para o teste comportamental foi delimitado virtualmente três zonas: topo, meio e fundo (B). Fonte: Rosemberg et al (2011).

3.5.3 Parâmetros analisados

O *Novel tank* tornou-se um modelo popular no estudo da ansiedade em peixes-zebra (Stewart et al., 2012). Neste modelo, a ansiedade é caracterizada pela alteração do comportamento natural do animal em explorar o novo ambiente e parâmetros locomotores são

empregados para analisar este comportamento. Para analisar alteração comportamental utilizamos os seguintes parâmetros: distância percorrida, velocidade média e tempo de permanência na zona topo, meio e fundo. Os parâmetros de locomoção foram mensurados ao término da gravação pelo software ANY-maze® (Stoelting CO, USA).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. A análise estatística utilizada foi selecionada de acordo com o desenho experimental utilizado e com o tipo de distribuição apresentado pelo conjunto dos dados. Os dados foram distribuídos normalmente (Shapiro-Wilk, $p > 0,05$) com variâncias iguais entre as amostras (teste de igualdade de variâncias, $p > 0,05$). Para comparação de três ou mais médias foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste Post Hoc de Tukey. Para a verificação da expressão gênica através de PCR quantitativo em tempo real, as variáveis foram analisadas através do teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste post-hoc de Dunn. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico IBM SPSS Statistics (Armonk, New York, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Ao avaliar a peroxidação lipídica em tecido cerebral de peixe-zebra, foi observado que somente o grupo WB-I apresentou aumento significativo nos níveis de TBA-RS em relação ao grupo controle ($p=0,0039$). Os demais grupos WB-2 e WB-9 não apresentaram diferenças significativas quando comparado com o grupo controle (Figura 5).

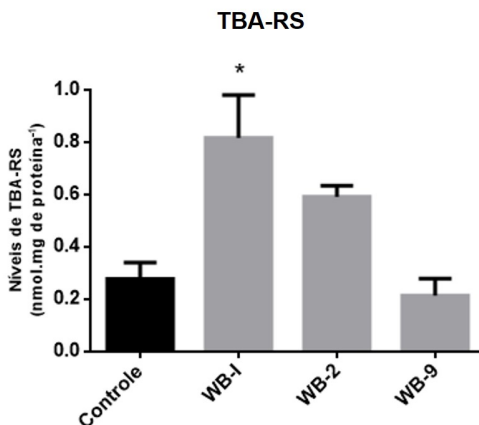


Figura 5: Efeito do *weekly-binge* nos grupos WB-I, WB-2 e WB-9 sobre os níveis de ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em cérebro total de peixe-zebra. Os resultados representam média \pm desvio padrão de 6 diferentes experimentos, cada um em duplicata. Os valores estão expressos em nmol.mg de proteína⁻¹. * $p<0,05$ em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

Para a verificação da formação de espécies reativas no tecido cerebral, foram quantificados os níveis de DCF (Figura 6). Os resultados mostram que somente o grupo WB-I apresentou um aumento significativo quando comparado ao controle ($p=0,0289$). Entretanto, os grupos WB-2 e WB-9 não foram alterados significativamente.

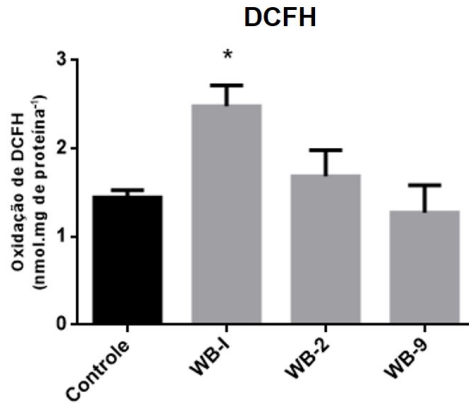


Figura 6: Efeito do *weekly-binge* nos grupos WB-1, WB-2 e WB-9 sobre a oxidação DCFH em cérebro total de peixe-zebra. Os resultados representam média \pm desvio padrão de 6 diferentes experimentos, cada um em duplicata. Os valores estão expressos em nmol.mg de proteína⁻¹. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

A avaliação das defesas antioxidantes foi caracterizada pela análise das enzimas SOD e CAT (Figura 7). Primeiramente, ao analisar atividade de SOD nenhum dos grupos apresentou diferença estatística em relação ao controle (Figura 7A). Ao investigar alterações na atividade da CAT, foi observada uma diminuição significativa da sua atividade nos grupos WB-2 e WB-9 em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$) (Figura 7B).

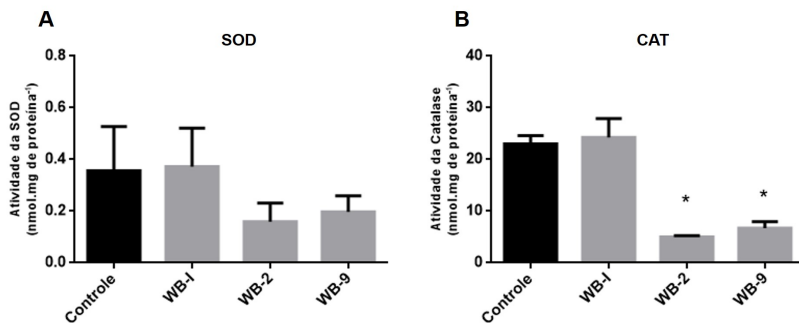


Figura 7: Efeito do *weekly-binge* nos grupos WB-I, WB-2 e WB-9 sobre as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) (A) e catalase (CAT) (B) em cérebro total de peixe-zebra. Os resultados representam média \pm desvio padrão de 6 diferentes experimentos, cada um em duplicata. Os valores das atividades enzimáticas estão expressos em nmol.mg de proteína⁻¹. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

4.2 PARÂMETROS NEUROINFLAMATÓRIOS

Uma vez que parâmetros de estresse oxidativo foram alterados e estes estão diretamente relacionados com a ativação de eventos inflamatórios, portanto avaliamos o efeito do *weekly-binge* no padrão de expressão para os genes relacionados as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β e anti-inflamatória, IL-10 (Figura 8A-C). Os resultados mostraram que não houve alteração significativa entre os grupos avaliados.

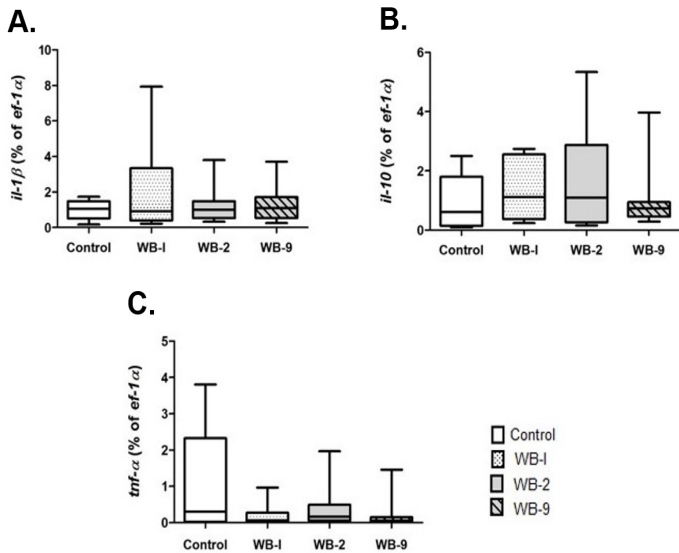


Figura 8 A-C: Efeito do *weekly-binge* sobre a expressão gênica das citocinas IL-1 β (A), TNF- α (B) e IL-10 (C) em cérebro total de peixe-zebra. Os resultados representam média \pm desvio padrão de 6 diferentes experimentos, cada um em duplicata. Os valores estão expressos em % de $ef-1\alpha$. Não houve diferença significativa em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis seguido de teste post-hoc de Dunn).

4.3 SISTEMA COLINÉRGICO

Para compreender se função dos neurônios colinérgicos são vulneráveis a exposição de quantidade abusiva e intermitente de etanol no peixe-zebra, duas importantes enzimas responsáveis tanto pela síntese como pela degradação de ACh foram avaliadas (Figura 9). A atividade da enzima ChAT foi verificada em cérebros de peixe-zebra submetidos ao *weekly-binge* (Figura 9A). O grupo WB-I apresentou um aumento significativo para a atividade da ChAT ($p < 0,0001$). Entretanto, não foi observada alteração significativa na atividade desta enzima quando avaliados o grupo WB-2. Já o grupo WB-9 apresentou uma redução significativa da atividade da ChAT ($p = 0,0351$) quando comparados ao grupo controle. Uma vez observado que o *weekly-binge* foi capaz de modular a atividade da enzima responsável pela síntese de ACh, o próximo objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade de outra enzima componente do sistema colinérgico, a AChE. Os grupos

WB-2 e WB-9 apresentaram redução da atividade ($p=0,0081$ para ambos grupos) de AChE quando comparado ao controle (Figura 9B).

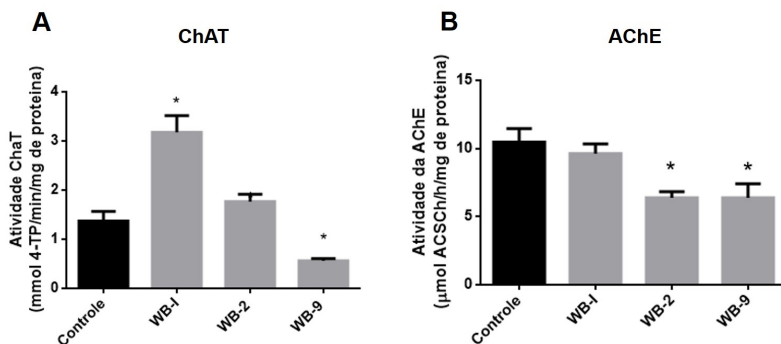


Figura 9: Efeito do *weekly-binge* nos grupos WB-I, WB-2 e WB-9 sobre a atividade das enzimas colinaetiltransferase (ChAT) (A) e acetilcolinesterase (AChE) (B) em cérebro total de peixe-zebra. Os resultados representam média \pm desvio padrão de 6 diferentes experimentos, cada um em duplicata. Os valores das atividades enzimáticas estão expressos em $\text{nmol 4-TP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ e $\mu\text{mol ACSCh/h/mg de proteína}$, respectivamente. $*p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

4.4 PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS

Considerando que respostas comportamentais estão ligadas aos sistemas neuroquímicos, o próximo passo foi avaliar se as alterações encontradas no sistema colinérgico poderiam ter desencadeado mudanças comportamentais. Para avaliar o perfil exploratório/locomotor em peixe-zebra submetidos ao modelo *weekly-binge* foi utilizado teste do *Novel tank*. Os parâmetros comportamentais avaliados neste teste foram: a distância percorrida, a velocidade média e o tempo de permanência em cada uma das zonas do aparato. Quando avaliado o perfil locomotor dos animais através da distância percorrida e velocidade média, não foi possível verificar alterações significativas entre os diferentes grupos com o seu respectivo controle (Figura 10).

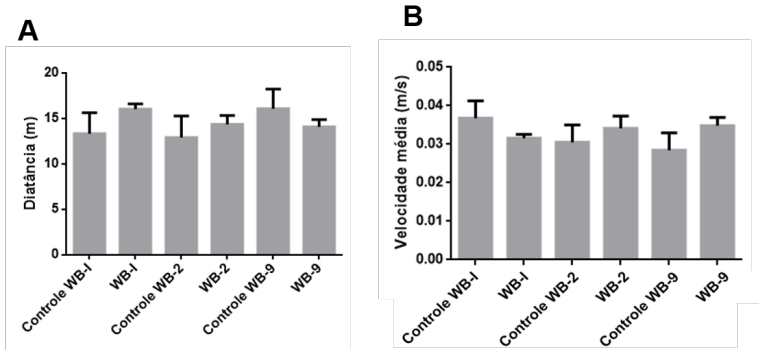


Figura 10: Avaliação do efeito do *weekly-binge* nos grupos WB-1, WB-2 e WB-9 sobre a distância total percorrida (A) e velocidade média (B) no aparato Novel tank. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

O tempo de permanência dos animais em cada zona foi mensurado durante 6 minutos, sendo que o resultado de cada grupo foi comparado ao seu respectivo controle (Figura 11). Na zona topo, somente o grupo WB-1 apresentou aumento significativo ($p < 0,0001$) no tempo de permanência, sendo que o mesmo grupo apresentou diminuição significativa ($p < 0,0001$) no tempo de permanência na zona fundo. O grupo WB-2 apresentou aumento significativo no tempo de permanência na zona meio ($p = 0,0483$) e diminuição significativa na zona fundo ($p = 0,0321$). O grupo WB-9 não apresentou diferença significativa no tempo de permanência em nenhuma das zonas. A alteração do perfil comportamental exploratório do peixe-zebra após diferentes tempos entre a última exposição ao etanol e a gravação podem ser visualizadas nas imagens que ilustram o tempo relativo de permanência (Figura 12A) e o traço de nado (Figura 12B) em cada zona.

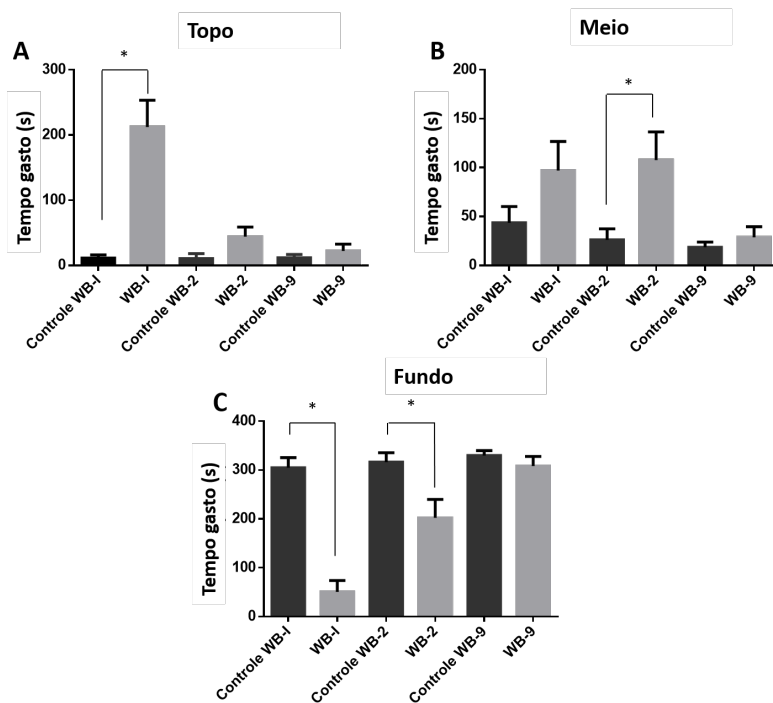


Figura 11: Avaliação do efeito do *weekly-binge* nos grupos WB-1, WB-2 e WB-9 sobre o tempo de permanência na zona topo (A), meio (B) e fundo (C) no aparato *Novel tank*. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida de post-hoc de Tukey).

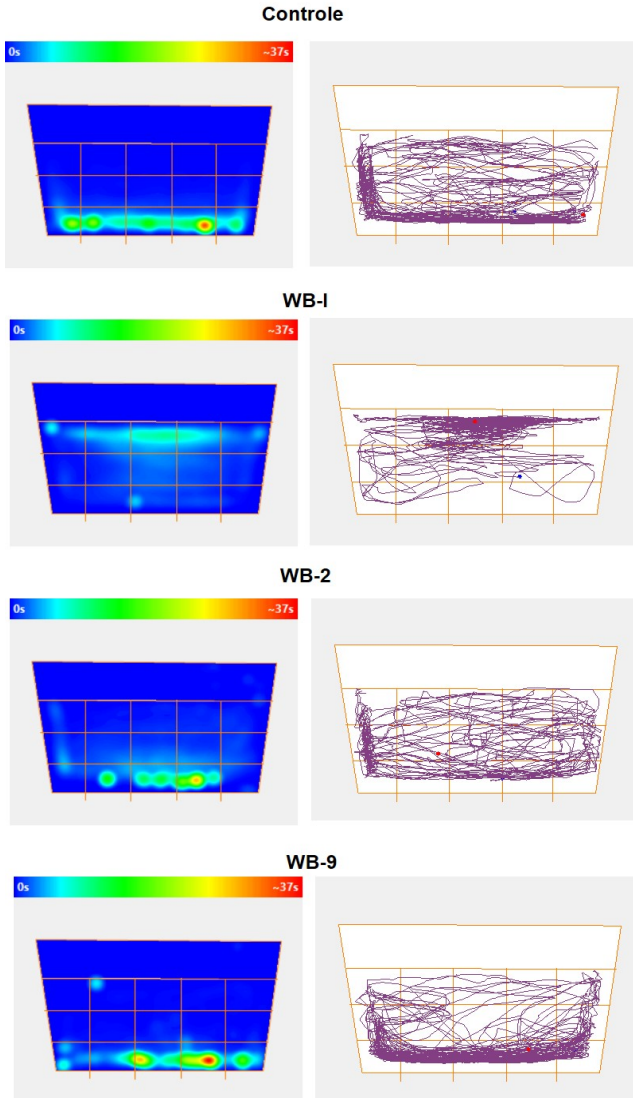


Figura 12: Avaliação do efeito do *weekly-binge* no tempo relativo de permanência (A) e traço de nado (B) nos grupos controle WB-1, WB-2 e WB-9. Conforme escala de coloração, a intensidade indica o tempo de permanência (A) e os traços indicam o perfil exploratório (B) em cada um dos compartimentos avaliados. Os dados foram obtidos pelo software ANY-maze®, Stoelting CO, USA.

5 DISCUSSÃO

O álcool é capaz de causar danos ao organismo por uma série de mecanismos, desde sua ação tóxica sobre as células dos sistemas bem como respostas geradas a partir dos produtos de sua metabolização. No consumo excessivo o quadro se agrava e os danos podem assumir grandes proporções, acarretando uma série de doenças e condições ao indivíduo. O interesse em avaliar os efeitos do consumo de álcool no padrão binge alcóolico sobre o organismo vem aumentando, uma vez que é um comportamento de consumo expressivo na sociedade. Considerando os mecanismos nocivos do etanol ao organismo o presente estudo buscou avaliar os efeitos de um modelo experimental que mimetiza o comportamento binge alcóolico em peixe-zebra e assim obter respostas que podem direcionar o esclarecimento sobre o impacto do etanol neste padrão de consumo.

A avaliação e compressão dos mecanismos do estresse oxidativo induzido pelo álcool tem sido evidenciada no consumo agudo e crônico, tanto em humanos como em modelos animais (Gerlai et al., 2000; Dlugos e Rabin, 2003; Spence et al., 2008; Nogales et al., 2014). Entretanto, ainda são poucos os estudos que avaliaram os efeitos do consumo intermitente de álcool sobre parâmetros oxidativos. Nesta dissertação, foi avaliado parâmetros oxidativos a fim de identificar se existe uma resposta oxidativa nas células do tecido cerebral de animais expostos ao etanol pelo modelo *weekly-binge*. Para avaliar se houve peroxidação lipídica, um mecanismo bem estabelecido no dano celular e usado como um indicador de estresse oxidativo, utilizamos a técnica dosagem de TAB-RS. Neste parâmetro, somente o grupo WB-I, que foi analisado imediatamente após a última exposição ao etanol, apresentou um aumento significativo, enquanto os outros grupos não apresentaram alteração. Estes achados permitem sugerir que o tempo após a retirada do *weekly-binge* foi capaz de gerar uma recuperação dos níveis deste parâmetro. Na peroxidação lipídica, substâncias oxidantes tais como as EROs, reagem com as duplas ligações carbono-carbono dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS) presentes abundantemente na membrana celular. No metabolismo do álcool, as EROs são produzidas por diversas vias, deixando a membrana e os componentes celulares suscetíveis ao dano oxidativo. No cérebro, o etanol pode ser metabolizado pela a ADH, catalase e enzimas do CYP450, mais especificamente pela CYP2E1, que é amplamente distribuída no tecido e sua ativação está acompanhada pela geração de EROs. A expressão da

CYP2E1 é induzida pela presença do etanol e conforme aumenta a quantidade desse substrato, maior será a atividade da enzima e do metabolismo do etanol, conseqüentemente havendo o aumento na geração de EROs. A CYP2E1 no metabolismo do etanol oxida NADPH e utiliza oxigênio molecular, resultado na produção de grandes quantidades de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$. No grupo WB-I, a peroxidação lipídica observada poderia estar atribuída pela exacerbada produção de EROs por parte do metabolismo do etanol no cérebro pela CYP2E1, ativada na presença de etanol cerebral. Em contraste, conforme aumentou o tempo entre a última exposição e os períodos avaliados (WB-2 e WB-9), os níveis de TBA-RS retornaram similarmente aos do grupo controle. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que na ausência do etanol, a CYP2E1 poderia estar com sua atividade reduzida, cessando a produção de EROs e possivelmente interrompendo o processo de peroxidação lipídica, que pode ser analisada pelos níveis de malondialdeído, um subproduto natural da oxidação dos PUFAS, que é quantificado na técnica de TBA-RS. De forma geral, podemos sugerir que o processo de peroxidação lipídica que estava ocorrendo no momento de exposição imediata ao *weekly-binge* teve seu processo cessado após dois e nove dias, o que pode estar relacionado a uma menor produção de EROs proveniente do metabolismo do etanol nestes grupos.

Para confirmar se espécies reativas estavam sendo produzidas nos grupos expostos ao *weekly-binge* realizamos a técnica de dosagem de DCFH no sentido de complementar os achados frente a verificação dos níveis de TBA-RS. Similarmente, somente o grupo WB-I apresentou resultado significativo em relação ao controle, indicando um aumento da produção de espécies reativas neste grupo. Este aumento pode ser justificado pelo fato da enzima CYP2E1 ser uma grande formadora de espécies reativas, principalmente $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 . Com o aumento significativo de TBA-RS e DCFH no grupo WB-I podemos sugerir os efeitos pró-oxidantes do etanol são evidentes imediatamente após a indução do modelo de *weekly-binge*. Além disso, uma vez que o processo de peroxidação lipídica e os níveis de espécies reativas foram reduzidos após dois e nove dias, isto nos permite sugerir que neste período poderia estar ocorrendo uma atenuação dos efeitos do etanol no tecido cerebral.

A vulnerabilidade do cérebro ao estresse oxidativo está diretamente relacionada com o potencial antioxidante das enzimas em eliminar as EROs. As enzimas SOD e CAT são responsáveis pela neutralização dos produtos $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , respectivamente, quando

formados em grande quantidade. Considerando a importância deste sistema, foram verificadas as atividades enzimáticas de SOD e CAT após o *weekly-binge*. No grupo WB-I a atividade de SOD e CAT não apresentou alteração. A atividade da SOD apresentou uma tendência para a redução de sua atividade nos grupos WB-2 e WB-9, enquanto que a CAT apresentou diminuição significativa nestes grupos quando comparado ao controle.

O possível mecanismo para a diminuição da atividade da CAT pode estar relacionado com a perda do sinergismo entre SOD e CAT, contribuindo no processo oxidativo. Durante a metabolização do etanol uma das EROs produzidas é o $O_2^{\cdot-}$, que por sua vez deverá ser dismutado pela SOD formando H_2O_2 (Palipoch e Koohmin, 2015). No presente trabalho não encontramos aumento na atividade da SOD, o que pode estabelecer um aumento nocivo dos níveis celulares de $O_2^{\cdot-}$, que por sua vez pode suprimir a atividade catalítica da CAT. Kono e Fridovich (1982) evidenciaram a inibição da catalase pelo $O_2^{\cdot-}$, bem como a reversão de sua inatividade na presença de SOD, comprovando a importância da sinergia entre as duas enzimas e do impacto que o $O_2^{\cdot-}$ tem sobre a homeostasia celular. A não diminuição de CAT no grupo WB-I pode ser explicado pelo fato dessa enzima também participar diretamente no metabolismo do etanol no cérebro (Zakhari, 2006). A diminuição tardia da CAT nos grupos WB-2 e WB-9 pode estar relacionada com um possível aumento de acetaldeído nesses grupos, no qual é formado na metabolização do etanol e que leva tempo até ser metabolizado pela ADHL. O acetaldeído além de contribuir na formação de EROs na sua metabolização, este produto é altamente reativo, podendo reagir com as estruturas celulares e formar aductos, inativando enzimas como a CAT (Tuma e Casey, 2003).

Resultados encontrados na literatura têm demonstrado diminuição na atividade das duas enzimas no cérebro em estudos com peixe-zebra expostos ao etanol em modelo crônico (Müller et al., 2017), porém quando a mesma dose foi testada de forma aguda, a SOD apresentou diminuição de atividade, enquanto CAT apresentou um aumento (Rosemberg et al., 2010b). Um estudo com modelo crônico de consumo de etanol em ratos demonstrou diminuição das atividades de SOD e CAT no tecido cerebral em doses elevadas (Das et al., 2007). Já um modelo de exposição crônica e intermitente em ratos demonstrou diminuição significativa da atividade de ambas enzimas em células hepáticas (Chen et al., 2009). Os diferentes e conflitantes resultados encontrados nas atividades de SOD e CAT frente a exposição ao etanol

em diferentes estudos podem estar relacionados ao modelo utilizado, quantidade e tempo de administração de etanol. Ainda são poucos os estudos que buscaram avaliar a resposta oxidativa no consumo intermitente de álcool, mais especificamente em peixe-zebra.

Além do efeito danoso direto sobre as células, a produção em excesso de EROs por diversas vias no consumo do álcool podem causar a neuroinflamação (Haroah et al, 2008), um processo caracterizado pela ativação e expressão de níveis não fisiológicos das células de defesa do SNC, como microglia e astrócitos (Harry and Kraft, 2008). O efeito do etanol sobre o sistema imune já é bem relatado, sendo que é capaz de induzir a inflamação por diversos mecanismos e em diversos órgãos, como o cérebro. Um dos mecanismos de indução da neuroinflamação no consumo do etanol é pelo processo de endotoxemia periférica, onde a liberação de citocinas na corrente sanguínea consequentemente atingem o SNC ao atravessar facilmente a barreira hematoencefálica. No cérebro, as citocinas periféricas podem estimular células da glia a liberarem mais citocinas, colaborando na instalação da neuroinflamação e suas consequências (Crews et al., 2006). Considerando a importância dos efeitos inflamatórios sobre o SNC no consumo do álcool, avaliamos expressão gênica de citocinas no tecido cerebral em animais tratados no modelo *weekly-binge*, sendo elas: citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β e a interleucina anti-inflamatória IL-10.

O modelo *weekly-binge* aplicado neste experimento não foi capaz de alterar a expressão gênica das citocinas em nenhum dos grupos quando comparados ao controle. Entretanto, este resultado não exclui que um processo inflamatório pudesse estar acontecendo em outros órgãos, uma vez que avaliamos a expressão gênica das citocinas apenas no tecido cerebral. O álcool é capaz de alterar permeabilidade intestinal, permitindo que produtos bacterianos pró-inflamatórios, como o lipopolissacarídeo (LPS), possam alcançar o fígado e a corrente sanguínea. As células de Kupffer presentes no fígado, reconhecem e se ligam a LPS via receptores específicos, iniciando uma cascata pró-inflamatória ao ativar fatores de transcrição, que por sua vez ativam a expressão de várias citocinas pró-inflamatórias que podem ser liberadas na circulação. Citocinas periféricas ao atingir o cérebro podem induzir as células residentes a produzir mais citocinas, podendo iniciar um processo de neuroinflamação (González-Reimers et al., 2014). Considerando este mecanismo, podemos supor, ainda que citocinas estivessem sendo produzidas em outros tecidos nos animais testados, o

padrão de expressão destas não foi modulado no tecido cerebral de peixe-zebra.

Diferentes modelos de tratamento crônico em roedores identificaram o aumento da expressão de uma série de citocinas pró-inflamatórias no tecido cerebral, dentre elas o TNF-alfa e a IL-1 β (Afonso-Loeches et al, 2010; Ehrlich et al., 2012; Qin e Crew, 2012; Zhao et al., 2013). Vallés et al (2004) evidenciaram, em um modelo de tratamento crônico de etanol *in vivo* e *in vitro*, que o processo de morte celular pode estar ligado com a neuroinflamação via aumento de expressão da citocina IL-1 β encontrado em ambos ensaios. Entretanto, em outro estudo crônico, o modelo utilizado não encontrou alteração significativa de TNF- α em cérebro de camundongos (Kane et al, 2013). Qin et al (2008), demonstraram em seu estudo que camundongos tratados com etanol em um modelo exposição intermitente apresentaram aumento da expressão gênica de TNF- α no cérebro, sem alterações para IL-1 β e IL-10. Já ao avaliar as mesmas citocinas em animais exposto a uma única dose de álcool, nenhum dos parâmetros sofreram alterações significativas. O estudo de processos inflamatórios em peixe-zebra é possível uma vez que este organismo apresenta os mesmos mecanismos básicos envolvidos em de doenças inflamatórias em humanos, tornando-se um modelo emergente para os estudos da inflamação (Forn-Cuní et al., 2017).

Diferentes resultados de marcadores inflamatórios avaliados em modelos de exposição ao etanol sugerem que uma complexa rede de mecanismo pode estar envolvida na ativação do sistema neuroimune, dentre elas o sinergismo entre sistema de neurotransmissão e sistema neuroimune (Crews et al., 2006). Estudos tem evidenciado a importância do sinergismo entre o sistema inflamatório e o sistema colinérgico, principalmente sobre as células inflamatórias no SNC. A desregulação de componentes colinérgicos pode contribuir para propagação de mecanismos inflamatórios, enquanto a desregulação do sistema inflamatório pode levar a perda de neurônios colinérgicos pelo processo de neuroinflamação (Shytle et al., 2004; Egea et al., 2015).

Considerando mecanismo de danos ao organismo no consumo excessivo de álcool e as respostas que estes podem levar aos sistemas de neurotransmissão no cérebro, buscamos avaliar mais especificamente os efeitos do etanol sobre o sistema colinérgico em cérebros de peixes-zebra submetidos ao *weekly-binge*. Ao avaliar a atividade de ChAT, o grupo WB-I apresentou um aumento significativo da atividade enzimática, podendo sugerir um aumento da produção de ACh. Já no

grupo WB-9, avaliado nove dias após o *weekly-binge*, percebeu-se uma diminuição significativa desta mesma enzima, sugerindo uma menor produção de ACh pelos neurônios colinérgicos. A alteração da atividade de ChAT pode consequentemente alterar a oferta de ACh na fenda sináptica e interferir na atividade AChE, enzima responsável por degradar este neurotransmissor. Conforme os resultados encontrados na atividade da ChAT, buscamos avaliar se atividade da AChE foi alterada no *weekly-binge*, onde encontramos uma diminuição significativa da atividade desta enzima nos grupos WB-2 e WB-9. Esta diminuição tardia da atividade de ChAT no grupo WB-9 e da AChE nos grupos WB-2 e WB-9 podem estar relacionadas com mecanismos pós metabolização do etanol, uma vez que nesses intervalos de tempo as vias de metabolização já o teriam oxidado. Dentre os mecanismos que podem estar relacionados com as alterações no sistema colinérgico seria o dano oxidativo. Os resultados encontrados na técnica de TBA-RS e DCFH nos permite sugerir que a peroxidação lipídica estava ocorrendo no grupo WB-I, sendo que os mesmos resultados podem explicar a diminuição da atividade enzimática encontrada nos grupos WB-2 e WB-9. Uma vez que evidências demonstram que a peroxidação lipídica esteja ocorrendo no momento imediato após a exposição ao etanol, sugere-se que as células do cérebro podem estar suscetíveis ao dano frente a ativação de vias apoptóticas, inclusive os neurônios colinérgicos. A diminuição tardia de ChAT e AChE após última exposição ao etanol encontrada nos grupos WB-2 e WB-9 podem ser uma resposta da morte de neurônios do sistema colinérgico. Porém, futuras análises tais como imunomarcação dos neurônios colinérgicos poderiam melhor elucidar esta hipótese.

A redução da atividade de ChAT e AChE, bem como os níveis de ACh foi correlacionada pela perda neurônios colinérgicos em estudos com roedores tratados cronicamente com etanol (Arendt et al, 1988; Miller e Rieck, 1993). Entretanto, Fernandes et al (2002) ao reproduzir um modelo similar de exposição ao etanol, não encontraram diminuição de neurônios colinérgicos. Um modelo de exposição binge alcóolico em roedores encontrou diminuição da expressão de genes responsáveis pela enzima ChAT bem como os genes responsáveis pelos receptores muscarínicos e nicotínicos (Coleman et al., 2011). O aumento da atividade de AChE foi encontrado em peixes-zebra tratados de forma aguda, entretanto ao avaliar os níveis de AChE mRNA, uma diminuição da expressão gênica foi encontrada. Estes resultados sugerem que o aumento da atividade de AChE não está diretamente relacionada com a

expressão gênica, onde outros mecanismos podem estar envolvidos modulação do sistema colinérgico na exposição ao etanol (Rico et al., 2007). A inibição das enzimas ChAT e AChE observadas nos grupos WB-2 e WB-9, também pode estar relacionada com a possível toxicidade induzida pelo acetaldeído e o acetato formado a partir do metabolismo do etanol. Os diferentes resultados encontrados para os marcadores do sistema colinérgico após diferentes modelos de exposição ao etanol demonstram que existe uma complexidade nos mecanismos envolvidos entre os efeitos do etanol sobre os sistemas de neurotransmissão. Os danos do etanol sobre o sistema colinérgico são importantes, uma vez que esta via é responsável por modular funções cognitivas e comportamentais ao organismo.

Considerando a importância desse sistema, foi avaliado o comportamento de peixes-zebras submetidos ao *weekly-binge*. A análise do comportamento locomotor e exploratório do peixe-zebra frente o efeito do etanol já é estabelecido como um método para avaliação do comportamento ansioso, sendo que o Novel tank é o teste mais comumente utilizado. Nesta dissertação, foi avaliado se o *weekly-binge* seria capaz de alterar o comportamento dos animais em diferentes períodos de tempo após a última exposição ao etanol. Diferentes parâmetros permitem avaliar o comportamento ansioso neste tipo de ensaio, como distância média de nado, velocidade média e tempo de preferência em determinadas regiões do aquário. Ao analisar a distância média de nado e da velocidade média, não encontramos alterações significativas em relação aos controles. Estes resultados eliminam o possível prejuízo do etanol sobre o sistema locomotor, o que poderia comprometer os resultados do parâmetro tempo de permanência nas zonas. Na análise do tempo de permanência, o grupo WB-I apresentou preferência significativa em permanecer no topo do aquário, sendo que este comportamento está associado a um comportamento menos ansioso. Quando os animais foram testados 48h após a terceira exposição ao etanol, a predisposição dos animais em permanecer no topo diminuiu, apresentando preferência significativa em manter-se na zona do meio. Já o grupo WB-9, testado após 9 dias da terceira exposição ao etanol, não apresentou diferença significativa ao seu controle correspondente. Estes resultados sugerem que o etanol promove uma resposta ansiolítica por um certo período (WB-I e WB-2), mas conforme o tempo aumenta após a última exposição (WB-9), os animais tentem a apresentar o mesmo comportamento do seu controle. No presente trabalho o grupo WB-I demonstrou maior preferência em permanecer no topo do aquário,

caracterizando um comportamento menos ansioso. O efeito ansiolítico do etanol se deve a suas propriedades em atuar em diferentes sistemas de neurotransmissão, como a via colinérgica (De Witte, 2004). Conforme os resultados obtidos nos parâmetros do sistema colinérgico, o mesmo grupo apresentou um aumento da atividade de ChAT, o que nos permite sugerir que os níveis de ACh estivessem aumentados na fenda sináptica neste momento. Já é descrito na literatura que receptores colinérgicos, mais especificamente os nAChR, podem modular a ansiedade ao serem estimulados por seus agonistas, como acetilcolina e nicotina (Picciott et al., 2002). Este mecanismo poderia explicar o efeito ansiolítico do etanol no grupo WB-I, uma vez que com a atividade aumentada de ChAT os níveis extracelulares de ACh poderiam estar elevados, causando uma estimulação em excesso dos nAChR. Portanto, estes achados permitem sugerir que no peixe-zebra a participação do sistema colinérgico poderia estar envolvida nos eventos comportamentais observados após o *weekly-binge*.

6 CONCLUSÃO

Diante os resultados obtidos, conclui-se que o modelo de exposição intermitente de etanol *weekly-binge* foi capaz de promover estresse oxidativo ao aumentar a produção de espécies reativas bem como diminuir a atividade das enzimas antioxidantes, contribuindo para o aumento da peroxidação lipídica. O sistema colinérgico demonstrou ser sensível ao *weekly-binge* ao ter alterações nas atividades das enzimas ChAT e AChE, sendo que essas alterações podem ser consequência de um dano oxidativo. Através dos resultados do teste *Novel tank* podemos concluir que o *weekly-binge* foi capaz de alterar o comportamento exploratório dos animais, podendo estar relacionado com a disfunção da via colinérgica. Os achados neste estudo evidenciam a importância dos efeitos nocivos do etanol sobre o cérebro no modelo que mimetiza o comportamento de consumo binge alcoólico em peixe-zebra, fomentando a importância da compressão dos mecanismos envolvidos nos danos que o álcool pode causar no organismo quando consumido no padrão binge.

REFERÊNCIAS

- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121-6.
- Afonso-Loeches S, Pascual-Lucas M, Blanco AM, Sanchez-Vera I, Guerri C. Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *J Neurosci.* 2010;(24):8285-95.
- Albano E, Tomasi A, Gloria-Gatti L, Dianzani MU. Spin trapping of free radical species produced during the microsomal metabolism of ethanol. *Chem Biol Interact.* 1988;65:223-34.
- Albuquerque EX, Pereira ERF, Alkondon M, Rogers SW. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 2009;98(1):73-120.
- Arendt T, Hennig D, Gray JA, Marchbanks R. Loss of neurons in the rat basal forebrain cholinergic projection system after prolonged intake of ethanol. *Brain Res Bull.* 1988;21(4):563-69.
- Arenzana FJ, Clemente D, Sanchez-Gonzalez R, Porteros A, Aijun J, Arevalo R. Development of the cholinergic system in the brain and retina of the zebrafish. *Brain Res. Bull.* 2005;66(4-6):421-5.
- Baldo G, Wu S, Howe RA, Ramamoothy M, Knutsen RH, Fang J, Mecham RP, Liu Y, Wu X, Atkinson JP, Ponder KP. Pathogenesis of aortic dilatation in mucopolysaccharidosis VII mice may involve complement activation. *Mol Genet Metab.* 2011;104(4):608-19.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1987;32:279-312.
- Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, Bedell JA, McPherson JD, Johnson SL. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* 2000;10(9):1351-8.
- Behra M, Cousin X, Bertrand C, Vonesch JL, Biellmann D, Chatonnet A, Strahle U. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nat Neurosci.* 2002;5(2):111-8.
- Berteli JFA. Avaliação da neurotransmissão colinérgica, estresse oxidativo e parâmetros inflamatórios em tecido cerebral de peixe-zebra exposto cronicamente ao etanol. [Dissertação de mestrado]. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde; 2017.
- Bertrand C, Chatonnet A, Takke C, Yan YL, Postlethwait J, Toutant JP, Cousin X. Zebrafish acetylcholinesterase is encoded by a single

- gene localized on linkage group 7. Gene structure and polymorphism; molecular forms and expression pattern during development. *J Biol Chem.* 2001;276(1):464-74.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9-19.
- Blank M, Guerim LD, Cordeiro RF, Vianna MR. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2009;92(4):529-34.
- Boehmler W, Obrecht-Pflumio S, Canfield V, Thisse C, Thisse B, Levenson R. Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. *Dev Dyn.* 2004;230(3):481-93.
- Bradford HF. *Chemical Neurobiology: An Introduction to Neurochemistry.* Freeman W.F. and Company. New York, 1976.
- Broughton RE, Milam JE, Roe BA. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA. *Genome Res.* 2001;11(11):1958-67.
- Burgen ASV. The background of the muscarinic systems. *Life Sci.* 1995;56(11-12):801-806.
- Caulfield MP, Birdsall N. International Union of Pharmacology. XVII Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Pharmacol Rev.* 1998;50(2):279-90.
- Capuron L, Miller AH. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. *Pharmacol. Ther.* 2011;130:226-38.
- Centers for Disease Control and Prevention. Vital signs: binge drinking prevalence, frequency, and intensity among adults — United States, 2010. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2012;61(1):14-9.
- Chao LP, Wolgram F. Purification and some properties of choline acetyltransferase. *J Neurochem.* 1973;20:1975-81.
- Charlet K, Beck A, Heinz A. The dopamine system in mediating alcohol effects in humans. *Curr Top Behav Neurosci.* 2013;13:461-88.
- Chastain LG, Sarkar DK. Role of microglia in regulation of ethanol neurotoxic action. *Int Rev Neurobiol.* 2014;118:81-103.
- Chatterjee D, Gerlai R. High precision liquid chromatography analysis of dopaminergic and serotonergic responses to acute alcohol exposure in zebrafish. *Behav Brain Res.* 2009;200(1):208-13.

- Clemente D, Porteros A, Weruaga E, Alonso JR, Arenzana, FJ, Aijon J, Arevalo R. Cholinergic elements in the zebrafish central nervous system: Histochemical and immunohistochemical analysis, *J Comp Neur.* 2004;474(1):75-107.
- Coleman LG, He J, Lee J, Styner M, Crews FT. Adolescent binge drinking alters adult brain neurotransmitter gene expression, behavior, brain regional volumes, and neurochemistry in mice. *Alcohol Clin Exp Res.* 2011;35(4):671-88.
- Costardi JV, Nampo RA, Silva GL, Ribeiro MA, Stella HJ, Stella MB, Malheiros SV. A review on alcohol: from the central action mechanism to chemical dependency. *Rev Assoc Med Bras.* 2015;61(4):381-7
- Courtney, KE, Polich, J. Binge drinking in young adults: Data, definitions, and determinants, *Psychological Bulletin.* 2009;135(1),142-56.
- Crews FT, Bechara R, Brown LA, Guidot DM, Mandrekar P, Oak S, Qin L, Szabo G, Wheeler M, Zou J. Cytokines and Alcohol. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006;30(4):720-30.
- Crews FT, Sarkar D, Phill D, Qin L, Zou, J, Boyadjieva N, Sci D, Vetreno RP. Neuroimmune Function and the Consequences of Alcohol Exposure. *Alcohol Res.* 2015;37(2):331-51.
- Cui C, Shurtleff D, Harris RA. Neuroimmune mechanisms of alcohol and drug addiction. *Int. Rev. Neurobiol.* 2014;118:1-12.
- Czirr E, Wyss-Coray T. The immunology of neurodegeneration. *J Clin Invest.* 2012;122(4):1156-63.
- Das SK, Hiran KR, Mukherjee S, Vasudevan DM. Oxidative stress is the primary event: Effects of ethanol consumption in brain. *Indian J Clin Biochem.* 2007;22(1):99-104.
- Das SK, Vasudevan DM. Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sci.* 2007;81(3):177-87.
- Dawson DA, Grant BF, Stinson FS, Chou PS. Another look at heavy episodic drinking and alcohol use disorders among college and noncollege youth. *J Stud Alcohol.* 2004;65(4):477-88.
- De Witte P. Imbalance between neuroexcitatory and neuroinhibitory amino acids causes craving for ethanol. *Addict Behav.* 2004;29(7):1325-39.
- Deitrich RA. Acetaldehyde: déjà vu du jour. *J Stud Alcohol.* 2004;65(5):557-72.

- Dlugos CA, Rabin RA. Ethanol effects on three strains of zebrafish: a model system for genetic investigations. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2003;74:471-80.
- Ebarasi L, Oddsson A, Hultenby K, Betsholtz C, Tryggvason K. Zebrafish: a model system for the study of vertebrate renal development, function, and pathophysiology. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2011;20(4):416-24.
- Edwards JG, Michel WC. Odor-stimulated glutamatergic neurotransmission in the zebrafish olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 2002;454(3):294-309.
- Egea J, Buendia I, Parada E, Navarro E, León R, Lopez MG. Anti-inflammatory role of microglial $\alpha 7$ nAChRs and its role in neuroprotection. *Biochem Pharmacol.* 2015;97(4):463-72.
- Ehlers CL, Criado JR, Wills DN, Liu W, Crews FT. Periadolescent ethanol exposure reduces adult forebrain ChAT+IR neurons: correlation with behavioral pathology. *Neuroscience.* 2011;199:333-45.
- Ehrlich D, Pirchl M, Humpel C. Effects of long-term moderate ethanol and cholesterol on cognition, cholinergic neurons, inflammation, and vascular impairment in rats. *Neuroscience.* 2012;15:154-66.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres RM. Feather-stone, A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 1961;7:88-95.
- Esel, E. Neurobiology of alcohol withdrawal inhibitory and excitatory neurotransmitters. *Turk. Psikiyatri. Derg.* 2006;17:17129-37.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990;186:407-21.
- Fernandes HL, Hodges-Savola CA. Tropic regulation of acetylcholinesterase isomerase isoenzymes in adult mammalian skeletal muscles. *Neurochem Res.* 1992; 17(1):115-24.
- Fernandes PA, Ribeiro AM, Pereira RF, Marra HL, Pittella JE. Chronic ethanol intake and ageing effects on cortical and basal forebrain cholinergic parameters: morphometric and biochemical studies. *Addict Biol.* 2002;7(1):29-36.
- Forn-Cuní G, Varela M, Pereiro P, Novoa B, Figueras A. Conserved gene regulation during acute inflammation between zebrafish and mammals. *Sci Rep.* 2017;7:41905.
- Froehlicher M, Liedtke A, Groh KJ, Neuhauss SC, Segner H, Eggen RI. Zebrafish (*Danio rerio*) neuromast: promising biological endpoint

- linking developmental and toxicological studies. *Aquat Toxicol.* 2000;95(4):307-19.
- García-Suástegui WA, Ramos-Chávez LA, Rubio-Osornio M, Calvillo-Velasco M, Atzin-Méndez JA, Guevara J, Silva-Adaya D. The Role of CYP2E1 in the Drug Metabolism or Bioactivation in the Brain. *Oxid Med Cell Longev.* 2017:e4680732.
- Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., and Rosenthal, A. Drinks like a fish: zebrafish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2000;67:773-82.
- Gerlai R, Lee V, Blaser R. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacol Biochem Behav.* 2006;85(4):752-61.
- Gilman J, Ramchandani V, Davis M, Bjork J, Hommer D. Why we like to drink: A functional magnetic resonance imaging study of the rewarding and anxiolytic effects of alcohol. *J Neurosci* 2008;28:4583-91.
- Goldsmith P. Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4(5):504-12.
- González-Reimers E, Santolaria-Fernández F, Martín-González MC, Fernández-Rodríguez CM, Quintero-Platt G. Alcoholism: A systemic proinflammatory condition. *World J Gastroenterol.* 2014;20(40):14660-71.
- Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol.* 2004;74(6):363-96.
- Groesell M, Wood CMJ. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *Exp Biol.* 2002;205(8):1179-88.
- Guo S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes Brain Behav.* 2004;3(2):63-74.
- Hanisch U, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience.* 2007;10(11):1387-94)
- Haorah J, Ramirez SH, Floreani N, Gorantla S, Morsey B, Persidsky Y. Mechanism of alcohol-Induced oxidative stress and neuronal injury. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(11):1542-50.
- Harry GJ, Kraft AD. Neuroinflammation and Microglia: Considerations and approaches for neurotoxicity assessment. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008;4(10):1265-77.
- Hoek JB, Pastorino JG. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol.* 2002.27(1):63-8.

- Holcombe A, Howorko A, Powell RA, Schalomon M, Hamilton TJ. Reversed scototaxis during withdrawal after daily-moderate, but not weekly-binge, administration of ethanol in zebrafish. *PLoS One*. 2013;8(5):e63319.
- Holmes A, Fitzgerald PJ, Macpherson KP, Debrouse L, Colacicco G, Flynn SM, Masneuf S, Pleil KE, Li C, Marcinkiewicz CA, Kash TL, Gunduz-Cinar O, Camp M. Chronic alcohol remodels prefrontal neurons and disrupts NMDAR mediated fear extinction encoding. *Nat Neurosci*. 2012;15(10):1359–61.
- Israel Y, Orrego H, Carmichael FJ. Acetate-mediated effects of ethanol. *Alcohol. clin. exp. res*. 1994;18:144-48.
- Kane CJM, Phelan KD, Douglas JC, Wagoner G, Johnson JW, Xu J, Drew PD. Effects of ethanol on immune response in the brain: region-specific changes in aged mice. *J Neuroinflammation*. 2013;10:66.
- Kalueff AV, Kaluyeva A, Maillet EL. Anxiolytic-like effect of noribogaine in zebrafish. *Behav Brain Res*. 2017;330:63-67.
- Kaslin J, Panula P. Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol*. 2001;440(4):342-77.
- Kelso ML, Liput DJ, Eaves DW, Nixon K. Upregulated vimentin suggests new areas of neurodegeneration in a model of an alcohol use disorder. *Neurosci*. 2011;197:381–93.
- Kim YJ, Nam RH, Yoo YM, Lee CJ. Identification and functional evidence of GABAergic neurons in parts of the brain of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci Lett*. 2004;355(1-2):29-32.
- Koch OR, Pani G, Borrello S, Colavitti R, Cravero A, Farré S, Galeotti T. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol Aspects Med*. 2004;25(1-2):191-8.
- Kono Y, Fridovich I. Superoxide Radical Inhibits Catalase. *J Biol Chem*. 1982;257(10):5751-4.
- Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacol*. 2010;35(1):217-238.
- Kroener S, Mulholland PJ, New NN, Gass JT, Becker HC, Chancler LJ. Chronic alcohol exposure alters behavioral and synaptic plasticity of the rodent prefrontal cortex. *PLoS One*. 2012;7(20):e37541.
- Kucenas S, Li Z, Cox JA, Egan TM, Voigt MM. Molecular characterization of the zebrafish P2X receptor subunit gene family. *Neuroscience*. 2003;121(4):935-45.

- Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 1992;5:227–31.
- Lele Z, Krone PH. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnol Adv.*1996;14(1):57-72.
- Levin ED, Cerruti DT. Chapter 15: Behavioral neuroscience of zebrafish. *Methods of behavior analysis in neuroscience.* Boca Raton, Florida: CRC press. 2009:293-311.
- Li Y, L. Liu, J. Kang, J.G. Sheng, S.W. Barger, R.E. Mrak, W.S. Griffin, Neuronal glial interactions mediated by interleukin-1 enhance neuronal acetylcholinesterase activity and mRNA expression, *J. Neurosci.* 20 (2000)149–155.
- Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet.* 2007;8(5):353-67.
- Lovinger DM, White G, Weight FF. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science.* 1989;243:1721-4.
- Lowry OH, Rosebroughv NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.
- Maher, JJ. Exploring alcohol's effects on liver function. *Alcohol health res world.* 1997;21(1)5-12.
- Marshall SA, McClain JA, Kelso ML, Hopkins DM, Pauly JR, Nixon K. Microglial activation is not equivalent to neuroinflammation in alcohol-induced neurodegeneration: The importance of microglia phenotype. *Neurobiol. Dis.*2013;53:239-51.
- Marshall SA, Geil CR, Nixon K. Prior Binge Ethanol Exposure Potentiates the Microglial Response in a Model of Alcohol-Induced Neurodegeneration. *Brain Sci.* 2016;6(2):e16.
- Mathur P, Guo S. Differences of acute versus chronic ethanol exposure on anxiety-like behavioral responses in zebrafish. *Behav Brain Res.* 2011;219(2):234-9.
- Mathur P, Lau B, Guo S. Conditioned place preference behavior in zebrafish. *Nat Protoc.* 2011;6(3):338-45.
- McKay EB, Placzek AN. Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol.* 2007;74(8):1120-33.
- Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen EG, Lockridge O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic

- pathways and can use butyrylcholinesterase hydrolyse acetylcholine. *Neuroscience*. 2002;110(4):627-39.
- Miller MW, Rieck RW. Effects of chronic ethanol administration on acetylcholinesterase activity in the somatosensory cortex and basal forebrain of the rat. *Brain Res* 1993;627:104-12.
- Montesinos J, Pascual M, Pla A, Maldonado C, Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Guerri C. TLR4 elimination prevents synaptic and myelin alterations and long-term cognitive dysfunctions in adolescent mice with intermittent ethanol treatment. *Brain Behav Immun*. 2015;45:233-44.
- Mullen, PW. The metabolism and pharmacokinetics of alcohol in man. 1977;17:49-55.
- Müller TE, Nunes SZ, Silveira A, Loro VL, Rosemberg DB. A Repeated ethanol exposure alters social behavior and oxidative stress parameters of zebrafish. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatr*. 2017;79:105-111.
- NIAAA, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (US). Tenth Special Report to the U.S. Congress on Alcohol and Health and Human Services. Secretary of Health and Human Services; 2000.
- NIAAA, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (US). Alcohol's Effects on the Body. NIAAA Newsletter; 2004a.
- NIAAA, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (US). National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism Council approves definition of binge drinking. NIAAA Newsletter, 2004;3:3b.
- NIAAA, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (US). Young adult drinking. Alcohol alert. NIAAA Newsletter. 2006;68:1-8.
- Nogales F, Rúa RM, Ojeda ML, Murillo ML, Carreras O. Oral or intraperitoneal binge drinking and oxidative balance in adolescent rats. *Chem Res Toxicol*. 2014;27(11):1926-33
- Obernier JA, White AM, Swartzwelder HS, Crews FT. Cognitive deficits and CNS damage after a 4-day binge ethanol exposure in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002;72(3):521-32.
- Ofek K, Soreq H. Cholinergic involvement and manipulation approaches in multiple system disorders. *Chem Biol Interact*. 2013;203(1)113-19.
- Orger M.B., de Polavieja G.G. Zebrafish behaviour: opportunities and challenges. *Annu Rev Neurosci*. 2017;40:125-47.

- Palipoch S, Koohmin P. Oxidative Stress-Associated Pathology: A Review. *Sains Malaysiana*. 2015;(10):1441-51.
- Paton, A. Alcohol in the body. *BMJ*.2005;330:85-87.
- Peng J, Wagle M, Mueller T, Mathur P, Lockwood BL, Breaud S, Guo S Ethanol-modulated camouflage response screen in zebrafish uncovers a novel role for cAMP and extracellular signal-regulated kinase signaling in behavioral sensitivity to ethanol. *J Neurosci*. 2009;29(26):8408-18.
- Petersen A, Silbereisen R, Sörenson S. Adolescent development: A global perspective. Social problems and social contexts in adolescence: Perspectives across boundaries. New York: Aldine de Gruyter; 1996. p.3-37.
- Picciott MR, Brunzell DH, Caldarone BJ. Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. *Neuroreport*. 2002;13(9):1097-106.
- Presley CA, Karmos JS. An instrument to assess adolescent alcohol involvement. *Addict Behav*. 1994;19(6):655-65.
- Pushpakiran G, Mahalakshmi K, Viswanathan P, Anuradha CV. Taurine prevents ethanol-induced alterations in lipids and ATPases in rat tissues. *Pharmacol Rep*. 2005; 57(5):578-87.
- Qin L, Crews FT. Chronic ethanol increases systemic TLR3 agonist-induced neuroinflammation and neurodegeneration. *J Neuroinflammation*. 2012;9:130.
- Qin L, He J, Hanes RN, Pluzarev O, Hong JS, Crews FT. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J Neuroinflammation*. 2008;5:10.
- Quertemont E, Tambour S, Tirelli E. The role of acetaldehyde in the neurobehavioral effects of ethanol: a comprehensive review of animal studies. *Prog Neurobiol*. 2005;75(4):247-74.
- Rao JS, Kellom M, Kim H, Rapoport SI. Neuroinflammation and Synaptic Loss. *Neurochem Res*. 2012;37(5):903–10.
- Rehm J. The risks associated with alcohol use and alcoholism. *Alcohol Res Health*. 2011;34(2):135-43.
- Rico EP, Rosemberg DB, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. *Toxicol Lett*. 2007;174(1-3):25-30.
- Rico EP, Rosemberg DB, Langoni Ada S, Souto AA, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD, Souza DO. Chronic ethanol treatment alters

- purine nucleotide hydrolysis and nucleotidase gene expression pattern in zebrafish brain. *Neurotoxicology*. 2011;32(6):871-8.
- Rico EP, Rosemberg DB, Senger MR, de Bem Arizi M, Dias RD, Souto AA, Bogo MR, Bonan CD. Ethanol and acetaldehyde alter NTPDase and 5'-nucleotidase from zebrafish brain membranes. *Neurochem Int*. 2008;52(1-2):290-6.
- Rico EP, Senger MR, Fauth Mda G, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. ATP and ADP hydrolysis in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Life Sci*. 2003;73(16):2071-82.
- Rink E, Guo S. The too few mutant selectively affects subgroups of monoaminergic neurons in the zebrafish forebrain. *Neuroscience*. 2004;127(1):147-54.
- Riveros-Rosas H, Julian-sanches A, Pina E. Enzimology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals. *Arch Med Res*. 1997;28(4):453-71.
- Rosemberg DB, Rico EP, Mussulini BH, Piato AL, Calcagnotto ME, Bonan CD, Dias RD, Blaser RE, Souza DO, de Oliveira DL. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. *PLoS One*. 2011;6(5):e19397.
- Rosemberg DB, Braga MM, Rico EP, Loss CM, Córdova SD, Mussulini BH, Blaser RE, Leite CE, Campos MM, Dias RD, Calcagnotto ME, de Oliveira DL, Souza DO. Behavioral effects of taurine pretreatment in zebrafish acutely exposed to ethanol. *Neuropharmacology*. 2012;63(4):613-23.
- Rosemberg DB, da Rocha RF, Rico EP, Zanotto-Filho A, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD, Moreira JC, Klamt F, Souza DO. Taurine prevents enhancement of acetylcholinesterase activity induced by acute ethanol exposure and decreases the level of markers of oxidative stress in zebrafish brain. *Neuroscience*. 2010b;171(3):683-92.
- Rosemberg DB, Rico EP, Langoni AS, Spinelli JT, Pereira TC, Dias RD, Souza DO, Bonan CD, Bogo MR. NTPDase family in zebrafish: Nucleotide hydrolysis, molecular identification and gene expression profiles in brain, liver and heart. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2010a;155(3):230-40.
- Savio LE, Vuaden FC, Rosemberg DB, Bogo MR, Bonan CD, Wyse AT. Long-term proline exposure alters nucleotide catabolism and ectonucleotidase gene expression in zebrafish brain. *Metab Brain Dis*. 2012;27(4):541-9.

- Scremin OU, Li MG, Scremin AM, Jenden DJ. Cholinesterase inhibition improves blood flow in the ischemic cerebral cortex. *Brain Res Bull.* 1997;42(1):59-70.
- Senger MR, Rico EP, Dias RD, Bogo MR, Bonan CD. Ecto-5'-nucleotidase activity in brain membranes of zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2004;139(2):203-7.
- Sharma R, Engemann SC, Sahota P, Thakkar MM. Effects of ethanol on extracellular levels of adenosine in the basal forebrain: an in vivo microdialysis study in freely behaving rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 2010;34:813-8.
- Shield KD, Parry C, Rehm J. Chronic diseases and conditions related to alcohol use. *Alcohol Res.* 2013;35(2):155-73.
- Shytle RD, Mori T, Townsend K, Vendrame M, Sun N, Zeng J, Ehrhart J, Silver A, Sanberg PR, Tan J. Cholinergic modulation of microglial activation by $\alpha 7$ nicotinic receptors. *J Chem.* 2004;89(2):337-43.
- Siegel GJ, Brady ST, Albers RW, Price DL. *Basic Neurochemistry. Principles of molecular, cellular and medical neurobiology.* 8^a ed. Oxford: Academic Press; 2012.
- Silva, CM. Avaliação neuroquímica do sistema colinérgico de camundongos com o gene do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT) modificado geneticamente. [tese de doutorado]. Pós-Graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular do Departamento de Farmacologia. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.
- Singer ML, Oreschak K, Rhinehart Z, Robison BD. Anxiolytic effects of fluoxetine and nicotine exposure on exploratory behavior in zebrafish. *Peer J.* 2016;4:e2352.
- Spear, LP. The adolescent brain and the college drinker: Biological basis of propensity to use and misuse alcohol. *Journal of Studies on Alcohol.* 2002;14(1):71-81.
- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev.* 2008;83:13-34.
- Sterling ME, Karatayev O, Chang GQ, Algava DB, Leibowitz SF. Model of voluntary ethanol intake in zebrafish: effect on behavior and hypothalamic orexigenic peptides. *Behav Brain Res.* 2015;278(1):29-39.
- Stern HM, Zon LI. Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(7):533-9.

- Stewart A, Gaikwad S, Kyzar E, Green J, Roth A, Kalueff AV. Stewart A1, Gaikwad S, Kyzar E, Green J, Roth A, Kalueff AV.. Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review. *Neuropharmacology* 2012;62(1):135-43.
- Stewart AM, Braubach O, Spitsbergen J, Gerlai R, Kalueff AV. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *Trends Neurosci.* 2014;37(5):264-78.
- Tinsley MR, Quinn JJ, Fanselow MS. The role of muscarinic and nicotinic cholinergic neurotransmission in aversive conditioning: comparing pavlovian fear conditioning and inhibitory avoidance. *Learn Mem.* 2004;11(1):35-42.
- Tomsovic M. "Binge" and continuous drinkers: Characteristics and treatment follow-up. *Q. j. stud. alcohol.* 1974;35:558-564.
- Tuma DJ, Casey, CA. Dangerous byproducts of alcohol breakdown: Focus on adducts. *Alcohol res. health.* 2003;27:285-90.
- Uchiyama T, Chess-Williams R. Muscarinic receptor subtypes of the bladder and gastrointestinal tract. *J Smooth Muscle Res.* 2004;40(6):237-47.
- Vallés SL, Blanco AM, Pascual M, Guerri C. Chronic Ethanol Treatment Enhances Inflammatory Mediators and Cell Death in the Brain and in Astrocytes. *Brain Pathol.* 2004;14(4):365-71.
- Vascotto SG, Beckham Y, Kelly GM. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochem Cell Biol.* 1997;75(5):479-85.
- Vetreno RP, Broadwater M, Liu W, Spear LP, Crews, FT. Adolescent, but Not Adult, Binge Ethanol Exposure Leads to Persistent Global Reductions of Choline Acetyltransferase Expressing Neurons in Brain. *PLoS One.* 2014;9(11):e113421.
- Viner RM, Taylor B. Adult outcomes of binge drinking in adolescence: findings from a UK national birth cohort. *J Epidemiol Community Health.* 2007; 61(1):902-7.
- Vuaden FC, Savio LE, Rico EP, Mussulini BH, Rosenberg DB, de Oliveira DL, Bogo MR, Bonan CD, Wyse AT. Methionine Exposure Alters Glutamate Uptake and Adenine Nucleotide Hydrolysis in the Zebrafish Brain. *Mol Neurobiol.* 2016 Jan;53(1):200-9.
- Ward RJ, Lallemand F, de Witte P. Biochemical and neurotransmitter changes implicated in alcohol-induced brain damage in chronic or 'binge drinking' alcohol abuse. *Alcohol Alcohol.* 2009a;44(2):128-35.

- Ward RJ, Colivicchi MA, Allen R, Schol F, Lallemand F, de Witte P, Ballini C, Corte LD, Dexter D. Neuro-inflammation induced in the hippocampus of 'binge drinking' rats may be mediated by elevated extracellular glutamate content. *J. Neurochem.* 2009b;111(5),1119–28.
- Wechsler H, Kuo M, Lee H, Dowdall GW. Environmental correlates of underage alcohol use and related problems of college students. *Am J Prev Med.* 2000;19(1):24-9.
- Wen X, Kanny D, Thompson WW, Okoro CA, Town M, Balluz LS. Binge drinking intensity and health-related quality of life among US adult binge drinkers. *Prev Chronic Dis.* 2012;9:86-106.
- WHO, World Health Organization. Global status report on alcohol and health. 2014. Geneva: World Health Organization; 2014.
- Wood, AM. Narcissism and Binge Drinking: Exploring the Role of Overconfidence and Confidence-Based Risk-Taking. [tese de doutorado]. Johnson City: Tennessee State University; 2010.
- Wu D, Zhai Q, Shi X. Alcohol-induced oxidative stress and cell responses. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006.21;3:26-9.
- Yang L, Ho NY, Alshut R, Legradi J, Weiss C, Reischl M, Mikut R, Liebel U, Müller F, Strähle U. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reprod. Toxicol.* 2009;28(2):245-53.
- Zakhari, S. Overview: How Is Alcohol Metabolized by the Body? *Alc Res Health* 2006;29(4):245-54.
- Zhao YN, Wang F, Fan YX, Ping GF, Yang JY, Wu CF. Activated microglia are implicated in cognitive deficits, neuronal death, and successful recovery following intermittent ethanol exposure. *Behav Brain Res.* 2013;236(1):270-82.
- Zimatkin SM, Pronko SP, Vasiliou V, Gonzalez FJ, Deitrich RA. Enzymatic Mechanisms of Ethanol Oxidation in the Brain. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30(9)1500-505
- Zirger JM, Beattie CE, McKay DB, BOYD RT. Cloning and expression of zebrafish neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Gene Expr. Patterns.* 2003;3(6): 747-54.

ANEXOS

ANEXO A - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais.



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



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação da neurotransmissão colinérgica e parâmetros inflamatórios em cérebro de peixe-zebra submetidos ao modelo de binge alcoólico**", registrada com o protocolo nº **034/2017-1**, sob a responsabilidade de **Eduardo Pacheco Rico**, junto à equipe: Karine Medeiros Vieira, Helena Cristina Zuehl Dal Toé, Samira Leila Baldin, Marcel Marcos Machado, Naithan Ludian Fernandes Costa - 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 **18/04/2017**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	19/04/2017 a 02/03/2018
Espécie/linhagem/raça	Peixe wild-type
Nº de animais	760
Idade/Peso	0-4 meses / 0,350g
Gênero	Masculino e Feminino
Origem	Biotério UFRGS

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the following Project:

Project title: "**Evaluation of cholinergic neurotransmission and brain inflammation of zebrafish submitted to the model of alcoholic binge**"

Protocol number: **034/2017-1**

Principal Investigator: **Eduardo Pacheco Rico**

Researchers: **Karine Medeiros Vieira, Helena Cristina Zuehl Dal Toé, Samira Leila Baldin, Marcel Marcos Machado, Naithan Ludian Fernandes Costa.**

The project 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 on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 18 de abril de 2017.